

**TGP/15/4 Draft 1 – Clean version****Original:** Inglés**Fecha:** 17 de septiembre de 2026**PROYECTO  
(REVISIÓN)**

Documento conexo a la  
Introducción general al examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad  
y a la elaboración de descripciones armonizadas de las obtenciones vegetales (documento TG/1/3)

**DOCUMENTO TGP/15****ORIENTACIÓN SOBRE EL USO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES  
EN EL EXAMEN DE LA DISTINCIÓN, LA HOMOGENEIDAD Y LA ESTABILIDAD (DHE)**

*Documento preparado por la Oficina de la Unión*

*para su examen por*

*el Comité Técnico, el Comité Administrativo y Jurídico, y el Consejo en 2026*

*Descargo de responsabilidad: el presente documento no constituye un documento de política u orientación de la UPOV*

## ÍNDICE

|                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUCCIÓN.....                                                                                                                                      | 3  |
| 2. MODELOS DE APLICACIÓN.....                                                                                                                             | 3  |
| 2.1 Marcadores moleculares ligados a caracteres .....                                                                                                     | 3  |
| <i>Ejemplo 1: Marcador genético específico para la tolerancia a los herbicidas .....</i>                                                                  | 4  |
| <i>Ejemplo 2: Marcador genético específico con información incompleta sobre el nivel de expresión de la resistencia a enfermedades en el tomate .....</i> | 5  |
| 2.2 Combinación de distancias fenotípicas y moleculares en la gestión de las colecciones de variedades .....                                              | 6  |
| <i>Ejemplo 1: Líneas parentales en el maíz .....</i>                                                                                                      | 6  |
| <i>Ejemplo 2: Selección genética de variedades similares para el primer ciclo de cultivo .....</i>                                                        | 10 |
| 3. DIRECTRICES PARA LA VALIDACIÓN DE UN NUEVO PROTOCOLO DE MARCADORES MOLECULARES LIGADOS A CARACTERES COMO MÉTODO ALTERNATIVO DE OBSERVACIÓN ..          | 11 |
| 3.1 Objetivos de las presentes directrices .....                                                                                                          | 11 |
| 3.2 Ámbito de aplicación de las presentes directrices.....                                                                                                | 11 |
| 3.3 Criterios de desempeño de un nuevo protocolo basado en marcadores moleculares .....                                                                   | 12 |
| <i>Especificidad.....</i>                                                                                                                                 | 12 |
| <i>Sensibilidad y límite de detección .....</i>                                                                                                           | 12 |
| <i>Repetibilidad .....</i>                                                                                                                                | 12 |
| <i>Reproducibilidad .....</i>                                                                                                                             | 13 |
| <i>Robustez.....</i>                                                                                                                                      | 14 |
| 3.4 Informe de validación.....                                                                                                                            | 14 |
| <i>Contenido del informe de validación .....</i>                                                                                                          | 14 |
| <i>Publicidad.....</i>                                                                                                                                    | 14 |
| 3.5 Protocolo estándar para marcadores moleculares ligados a caracteres .....                                                                             | 14 |
| 3.6 Estudio de seguimiento tras la aprobación.....                                                                                                        | 17 |
| 3.7 Bibliografía .....                                                                                                                                    | 17 |

## 1. INTRODUCCIÓN

1.1 En el documento UPOV/INF/18, "Posible utilización de marcadores moleculares en el examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad (DHE)", se examinan los posibles modelos de aplicación en lo que respecta a la utilización de marcadores bioquímicos y moleculares en el examen DHE que el Comité Técnico (TC) propuso al Subgrupo Especial de Expertos Técnicos y Jurídicos sobre Técnicas Bioquímicas y Moleculares (Grupo de Consulta del BMT) sobre la base de la labor realizada por el Grupo de Trabajo sobre Técnicas Bioquímicas y Moleculares, y Perfiles de ADN en particular (BMT) y de los subgrupos especiales sobre cultivos para la utilización de las técnicas moleculares (subgrupos sobre cultivos) (véase: <http://www.upov.int/about/es/organigram.html>). En el documento UPOV/INF/18, se presenta tanto la evaluación de esos modelos por el Grupo de Consulta del BMT como las opiniones del Comité Técnico y el Comité Administrativo y Jurídico (CAJ) al respecto.

1.2 El propósito del presente documento es dar orientación sobre la utilización de marcadores bioquímicos y moleculares en el examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad (DHE) a partir de los modelos que hayan recibido una evaluación favorable y respecto de los cuales se hayan dado ejemplos aceptados.

1.3 Las únicas obligaciones vinculantes de los miembros de la Unión son las que constan en el texto del Convenio de la UPOV, por lo que el presente documento no debe interpretarse de manera tal que no esté en consonancia con el Acta pertinente al miembro de la Unión de que se trate.

1.4 En el presente documento se utilizan las siguientes abreviaturas:

|                            |                                                                                             |
|----------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------|
| CAJ:                       | Comité Administrativo y Jurídico                                                            |
| TC:                        | Comité Técnico                                                                              |
| TWP:                       | Grupos de Trabajo Técnico                                                                   |
| BMT:                       | Grupo de Trabajo sobre Técnicas Bioquímicas y Moleculares, y Perfiles de ADN en particular  |
| Grupo de consulta del BMT: | Subgrupo Especial de Expertos Técnicos y Jurídicos sobre Técnicas Bioquímicas y Moleculares |
| Subgrupos sobre Cultivos:  | Subgrupos Especiales sobre Cultivos y Técnicas Moleculares                                  |

## 2. MODELOS DE APLICACIÓN

### 2.1 Marcadores moleculares ligados a caracteres

2.1.1 Los marcadores moleculares se pueden utilizar, a efectos del examen DHE, como método de examen de los caracteres que cumplen los criterios que figuran en la sección 4.2 del Capítulo 4 de la Introducción General, como se explica a continuación.

- a) el examen para el marcador se realiza en el mismo número de plantas individuales y con los mismos criterios para establecer la distinción, la homogeneidad y la estabilidad que en el examen del carácter mediante ensayo biológico;
- b) se comprueba la fiabilidad de la vinculación entre el marcador y el carácter;
- c) los marcadores diferentes para el mismo carácter constituyen métodos diferentes de examen del mismo carácter;
- d) los marcadores vinculados a genes diferentes que confieren la expresión del mismo carácter constituyen métodos diferentes de examen del mismo carácter; y
- e) los marcadores vinculados a elementos reguladores diferentes del mismo gen que confieren la expresión del mismo carácter constituyen métodos diferentes de examen del mismo carácter.

2.1.2 Los párrafos 2.1.5 a 2.1.18 contienen ejemplos del uso de marcadores moleculares ligados a caracteres.

2.1.3 Incumbe a la autoridad competente determinar si se han cumplido las premisas al aplicar el modelo y los ejemplos que figuran en los párrafos 2.1.5 a 2.1.18.

2.1.4 Para que se incluya en las directrices de examen un método basado en el modelo, el Grupo de Trabajo Técnico competente y el TC deberán convenir en que se ha satisfecho el requisito de fiabilidad del vínculo entre el gen y la expresión del carácter.

#### Ejemplo 1: Marcador genético específico para la tolerancia a los herbicidas

Elaborado por expertos de Francia

2.1.5 Una variedad se modifica genéticamente mediante la inserción de un gen para la tolerancia al herbicida “Fórmula X”. Las variedades que contienen este gen no se ven afectadas cuando se les pulveriza con la Fórmula X, mientras que las variedades que no tiene este gen mueren sistemáticamente si se las pulveriza con este herbicida particular. La tolerancia a la Fórmula X, examinada en ensayos de campo mediante la pulverización de parcelas, es un carácter DHE aceptado, y puede utilizarse para establecer la distinción entre variedades.

2.1.6 Se propone que, en lugar de pulverizar las variedades en las parcelas (debido a la dificultad de organizarlo en los ensayos DHE estándar), se examine el carácter “tolerancia a la Fórmula X” realizando un examen para detectar la presencia de un marcador molecular ligado al gen. Este marcador se ubica en una parte de la “construcción” génica. La “construcción” génica comprende todos los elementos que se insertan en la planta durante la modificación genética y, además del propio gen en sí, contiene elementos adicionales para regular el gen una vez que se encuentre en la planta. El marcador puede estar situado dentro del gen, parcialmente sobre el gen o fuera del propio gen.

#### Premisas del ejemplo

2.1.7 El ejemplo se basa en las siguientes premisas:

a) El examen DHE

2.1.8 Se presume que el examen para el marcador tendrá el mismo alcance que el ensayo en campo, es decir, el mismo número de plantas individuales, durante el mismo número de años y con los mismos criterios para establecer la distinción, la homogeneidad y la estabilidad.

b) Fiabilidad de los vínculos

2.1.9 Se presume que se controlará el vínculo entre el marcador y el gen a fin de garantizar que el marcador sea un predictor fiable de la tolerancia a la Fórmula X. Este control será necesario para garantizar, por ejemplo, que el marcador no se separe del gen y que la presencia del gen siga dando como resultado la tolerancia a la Fórmula X.

c) Creación de marcadores moleculares diferentes para el mismo gen

2.1.10 Quizás sea posible elaborar distintas construcciones génicas que contengan la tolerancia a la Fórmula X e identificar marcadores moleculares independientes para dichas construcciones génicas individuales, todos ellos vinculados a exactamente el mismo gen de tolerancia a la Fórmula X. Si todos los distintos marcadores para el mismo gen se aceptasen como métodos diferentes para examinar el mismo carácter fenotípico existente, el enfoque sería el mismo. Para la utilización de “[...] [marcadores] moleculares como predictores de caracteres tradicionales”, debe partirse de la base de que los marcadores corresponden a un carácter tradicional, a saber, un carácter aprobado existente. Por consiguiente, se presume que los distintos marcadores para el mismo gen se tratarían como si fuesen distintos métodos para examinar el mismo carácter, a saber, la tolerancia a la Fórmula X.

d) Distintos genes que producen tolerancia al mismo herbicida

2.1.11 Quizás sea posible crear distintos genes que confieran tolerancia a la Fórmula X. En el caso más simple, esto podría considerarse del mismo modo que los distintos marcadores para el mismo gen, es decir, los distintos genes, con sus marcadores respectivos, se considerarían como métodos diferentes para examinar el mismo carácter, a saber, la tolerancia a la Fórmula X. No obstante, es muy posible que los distintos genes posean un mecanismo químico diferente para producir la tolerancia a la Fórmula X. Por consiguiente, las sustancias químicas producidas por los distintos genes serán diferentes y dichas sustancias

químicas podrán constituir la base para establecer la distinción en ciertas circunstancias. No obstante, en virtud de este modelo sería necesario en primer lugar aprobar los componentes químicos como caracteres de la UPOV, antes de aceptar marcadores moleculares vinculados a dichos caracteres potenciales. Esto podría, a su vez, constituir un ejemplo separado. Por consiguiente, se presume que distintos genes serían tratados como distintos métodos para examinar el mismo carácter, a saber, la tolerancia a la Fórmula X.

- e) Distintas construcciones génicas que producen la misma tolerancia al herbicida pero con distinto control de la expresión

2.1.12 También es posible que se desarrollen diferentes construcciones génicas que contengan el mismo gen de tolerancia a la Fórmula X, pero que presenten un control regulador diferente. Por ejemplo, los elementos reguladores podrían hacer que la tolerancia a la Fórmula X solo se activara en determinadas fases del desarrollo. Para simplificar, en este ejemplo se presume que los distintos marcadores vinculados a distintos elementos reguladores para el mismo gen se tratarán como métodos diferentes para examinar el mismo carácter de tolerancia a la Fórmula X. No obstante, cabe esperar que esta cuestión se examine más a fondo en una etapa posterior.

#### Ejemplo 2: Marcador genético específico con información incompleta sobre el nivel de expresión de la resistencia a enfermedades en el tomate

Elaborado por expertos del Reino de los Países Bajos

2.1.13 La presencia del alelo *Tm1* del gen *Tm1* o de los alelos *Tm2* o *Tm2<sup>2</sup>* del gen *Tm2* confiere resistencia a la cepa 0 del virus del mosaico del tomate (ToMV).

2.1.14 Un solo marcador señala la presencia de los alelos de resistencia *Tm2* y *Tm2<sup>2</sup>* y del alelo susceptible *tm2*. Es el marcador *Tm2/2<sup>2</sup>* el cual está posicionado en la secuencia que codifica la proteína.

2.1.15 Una variedad es resistente a la cepa 0 del ToMV si es portadora del alelo de resistencia *Tm2* o del alelo de resistencia *Tm2<sup>2</sup>*.

2.1.16 Una variedad homocigótica *tm2/tm2* es susceptible a la cepa 0 del ToMV, a no ser que el alelo de resistencia *Tm1* codifique la resistencia. En este caso, no es posible determinar la resistencia a la cepa 0 del ToMV mediante el análisis del marcador de ADN, porque no existe un marcador fiable del gen *Tm1*.

Cuadro 1. Resumen esquemático de la resistencia al virus del mosaico del tomate y los alelos de resistencia:

|                                   |                                       |                                                                                                                                                                                                      |                                                           |
|-----------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Genotipo                          | <i>tm2/tm2</i><br>y<br><i>tm1/tm1</i> | <i>Tm2/Tm2</i> o <i>Tm2<sup>2</sup>/Tm2<sup>2</sup></i> o<br><i>Tm2<sup>2</sup>/Tm2</i> o<br><i>Tm2/tm2</i> o <i>Tm2<sup>2</sup>/tm2</i><br>y<br><i>Tm1/Tm1</i> o <i>Tm1/tm1</i> o<br><i>tm1/tm1</i> | <i>tm2/tm2</i><br>y<br><i>Tm1/Tm1</i> o<br><i>Tm1/tm1</i> |
| Marcador <i>Tm2/2<sup>2</sup></i> | alelo susceptible                     | alelo resistente                                                                                                                                                                                     | alelo susceptible                                         |
| Resistencia a la cepa 0 del ToMV  | ausente                               | presente                                                                                                                                                                                             | presente                                                  |

2.1.17 Si se declara que una variedad es resistente a la cepa 0 del ToMV, se puede realizar un análisis del marcador de ADN. En los casos en que la resistencia se base en la presencia de los alelos *Tm2* o *Tm2<sup>2</sup>*, el análisis del marcador de ADN puede reemplazar al bioanálisis tradicional.

2.1.18 Si el análisis del marcador de ADN no confirma la resistencia declarada o si se declara que la variedad es susceptible, se debe realizar un bioanálisis.

## **2.2 Combinación de distancias fenotípicas y moleculares en la gestión de las colecciones de variedades**

### Ejemplo 1: Líneas parentales en el maíz

2.2.1 Una característica fundamental del proceso encaminado a eliminar variedades notoriamente conocidas con anterioridad al ensayo en cultivo DHE es que el umbral se establece con un margen de seguridad adecuado. Este umbral se denomina umbral de “distinción plus”, esto es que las distancias entre la variedad candidata y las variedades que presentan “distinción plus” son lo suficientemente marcadas como para poder tomar una decisión sin tener que establecer una comparación directa en el ensayo en cultivo.

2.2.2 Puede utilizarse una combinación de diferencias fenotípicas y distancias moleculares para determinar qué variedades de la colección de variedades han de compararse con las variedades candidatas para mejorar la selección de las variedades que presentan “distinción plus”, como se explica a continuación:

a) se cuenta con información fiable de que las distancias moleculares están suficientemente relacionadas con las diferencias fenotípicas, de modo que:

b) el método selecciona variedades de la colección de variedades que son similares a las variedades candidatas; y

c) el método no aumenta el riesgo de no seleccionar una variedad de la colección de variedades que sea necesario comparar con las variedades candidatas en el ensayo en cultivo.

2.2.3 Los párrafos 2.2.4 a 2.2.16 constituyen un ejemplo, elaborado por expertos de Francia, del uso de la combinación de las diferencias fenotípicas y las distancias moleculares en la gestión de las colecciones de variedades.

### Descripción

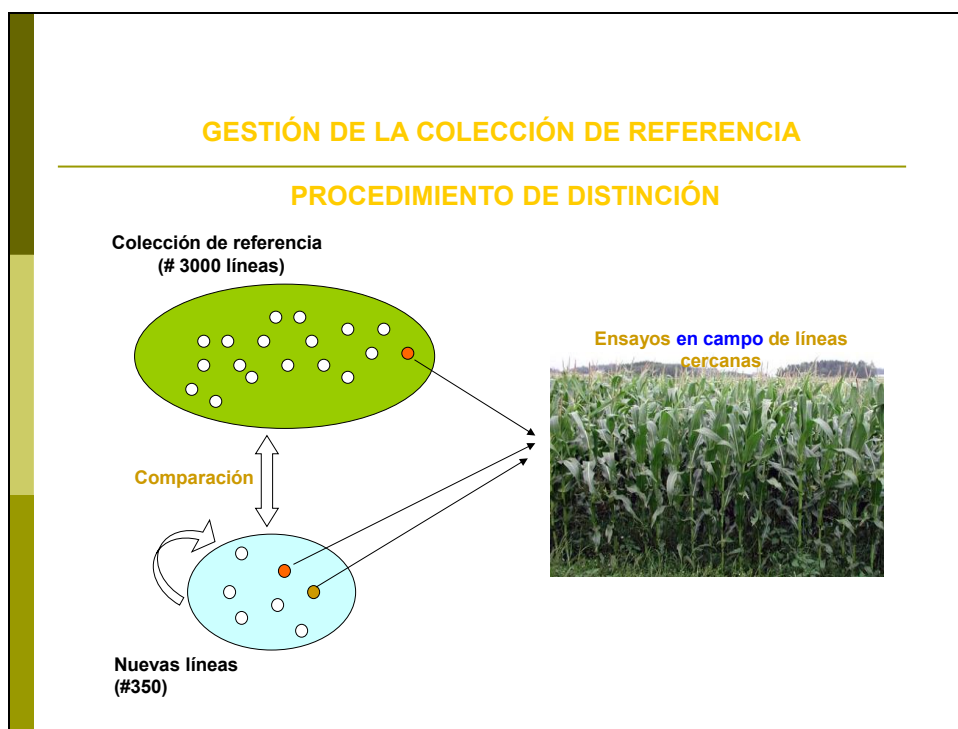
2.2.4 Una característica fundamental del proceso encaminado a eliminar variedades notoriamente conocidas con anterioridad al ensayo en cultivo DHE es que el umbral para decidir qué variedades pueden excluirse (es decir, variedades distintas en base a las descripciones) pueda establecerse con un adecuado margen de seguridad, ya que las variedades que se eliminan no se incluirán en el ensayo en cultivo. Este umbral, con un margen de seguridad, se denomina umbral de “distinción plus”, esto es que las distancias entre la variedad candidata y las variedades que presentan “distinción plus” son lo suficientemente marcadas como para poder tomar una decisión sin tener que establecer una comparación directa en el ensayo en cultivo.

2.2.5 La finalidad de este ejemplo es crear un instrumento eficaz, basado en la combinación de distancias fenotípicas y moleculares, para identificar, en la colección de variedades, aquellas variedades que deben compararse con las variedades candidatas (véase el gráfico 1) a fin de mejorar la selección de variedades con “distinción plus” y limitar, así, el volumen de trabajo sin que disminuya la calidad del ensayo. La dificultad estriba en desarrollar un sistema seguro que:

a) seleccione únicamente variedades similares a las variedades candidatas, y

b) limite el riesgo de no seleccionar una variedad en la colección de variedades que deba compararse en cultivo, especialmente en los casos en que la colección de variedades es amplia o cara.

Gráfico 1



2.2.6 El nuevo sistema se ha configurado a partir del siguiente material:

- a) Estudios existentes sobre las distancias moleculares en el maíz, aplicables a los ensayos DHE y al establecimiento de derivación esencial, en los que se muestra la relación de parentesco entre variedades (véanse los documentos BMT/3/6 "*The Estimation of Molecular Genetic Distances in Maize or DUS and ED Protocols: Optimization of the Information and new Approaches of Kinship*" y BMT/3/6 Add.)
- b) Un experimento llevado a cabo por GEVES en un conjunto de líneas parentales del maíz que muestra que existe un vínculo entre la evaluación de la distinción por parte de expertos (evaluación global) y la distancia molecular calculada utilizando datos moleculares de Secuencias Simples Repetidas (SSR) (véase el gráfico 2).

#### Componentes del sistema

##### *Distancia GAIA*

2.2.7 El componente de la distancia GAIA se calcula mediante el programa informático GAIA desarrollado por GEVES. La distancia GAIA es una combinación de diferencias observadas en caracteres fenotípicos: cada diferencia observada sirve para calcular la distancia según la fiabilidad de los caracteres, especialmente en lo que respecta a su variabilidad y su susceptibilidad al medio ambiente. Cuanto mayor es la diferencia observada y mayor es la fiabilidad del carácter, más contribuye la diferencia al cálculo de la distancia GAIA. Únicamente se incluyen las diferencias que son iguales o mayores que la distancia mínima requerida por cada uno de los caracteres.

##### *Distancia molecular*

2.2.8 El componente de la distancia molecular se calcula a partir de las diferencias observadas en un conjunto de marcadores. Se pueden utilizar distintos tipos de marcadores y distancias moleculares. En el caso del estudio elaborado en Francia con respecto al maíz, se utilizaron 60 marcadores SSR y la distancia de Rogers. Es importante que se utilicen suficientes marcadores con una buena distribución en los cromosomas. Es necesario considerar el tipo de marcadores, el efecto del número de marcadores y la distribución de marcadores con arreglo a las especies de que se trate.

2.2.9 Antes de combinar estos dos componentes, debe efectuarse, a cargo de un grupo de expertos y con respecto a un conjunto de pares de variedades, una evaluación de la relación entre la distancia molecular y una evaluación general de la distinción. En el caso del maíz, la evaluación se hizo como se explica a continuación:

Material: 504 pares de variedades examinadas en paralelo mediante marcadores moleculares

Disposición del cultivo: pares de variedades cultivadas en paralelo  
(1 parcela = 2 hileras de 15 plantas)

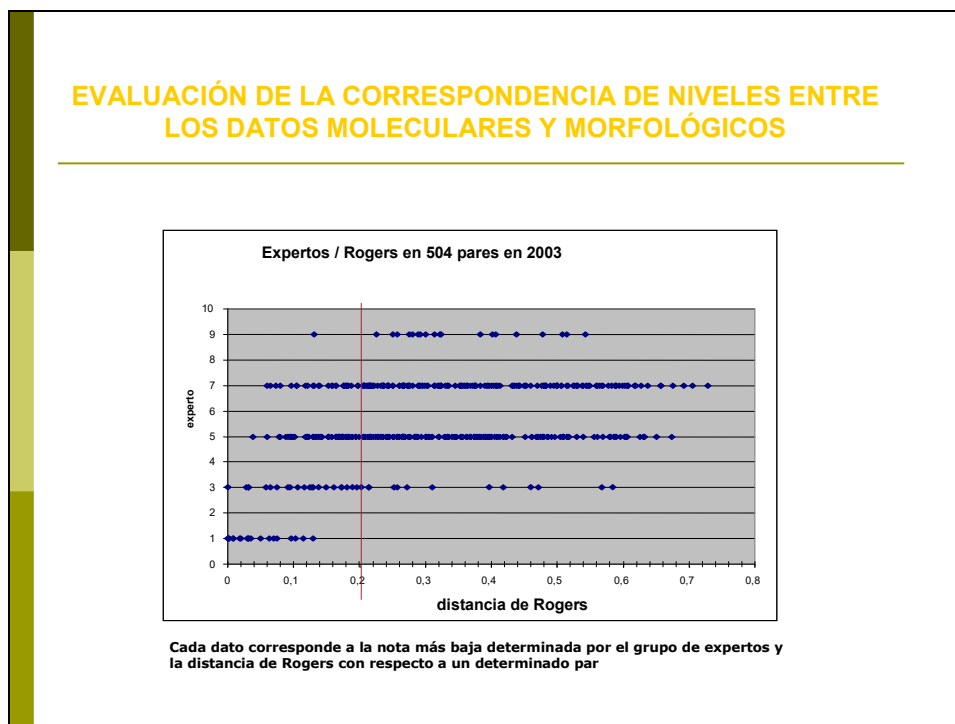
Evaluación visual por expertos en cultivos del maíz:

Escala de similitud:

1. las dos variedades son similares o muy parecidas
3. las dos variedades son distintas pero se parecen
5. la comparación es útil, pero las variedades son claramente distintas
7. la comparación no era necesaria, porque las variedades son muy diferentes
9. la comparación no era necesaria, porque las variedades son totalmente diferentes  
(en la escala no se utilizan las notas “pares”)

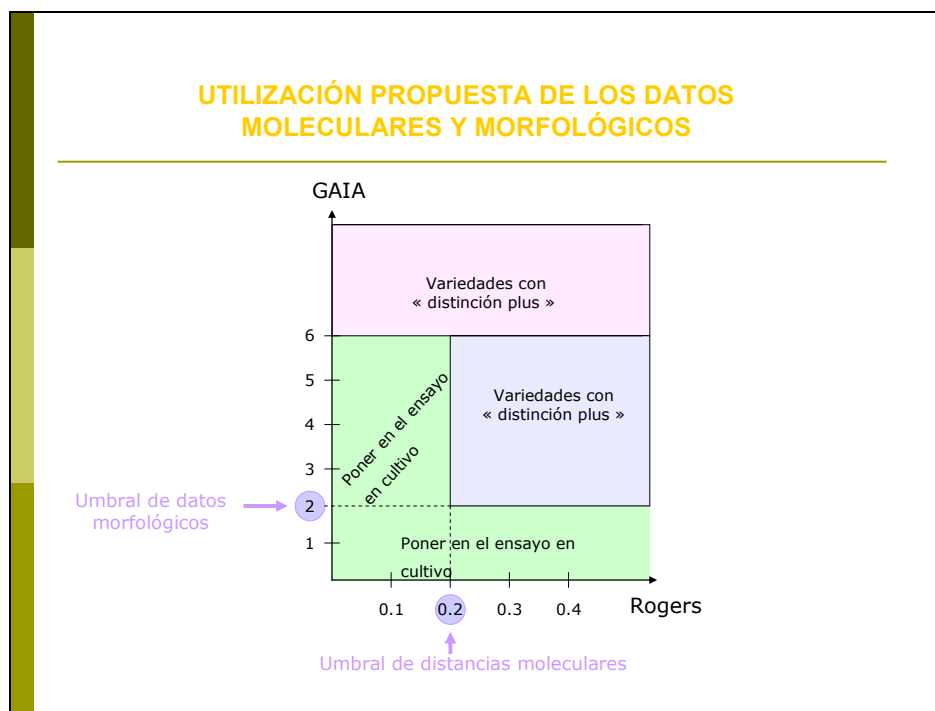
2.2.10 En el caso del maíz, esta evaluación mostró que ninguna línea parental con una distancia molecular superior a 0,15 fue considerada similar o muy parecida mediante evaluación por expertos en el examen DHE (véase el gráfico 2).

Gráfico 2



2.2.11 Sobre la base de ese resultado, la combinación de distancias morfológicas y moleculares ofrece la posibilidad de establecer el siguiente esquema de decisión (véase el gráfico 3):

Gráfico 3



2.2.12 Todos los pares de variedades que presenten una distancia GAIA igual o mayor a 6 y todas las variedades que presenten una distancia GAIA entre 2 y 6, más una distancia molecular igual o mayor a 0,2, se consideran variedades con “distinción plus”.

2.2.13 Este esquema muestra que es necesario observar menos líneas parentales en el cultivo en comparación con la situación en que se utiliza únicamente una distancia GAIA de 6.

2.2.14 La solidez de este sistema ha sido contrastada mediante distintas distancias GAIA y moleculares.

#### Ventajas e inconvenientes

##### 2.2.15 Ventajas

- a) Mejora de la gestión de las colecciones de variedades y reducción del número de variedades que deben compararse en el cultivo.
- b) Utilización de distancias morfológicas y moleculares con umbrales definidos por expertos en el examen DHE. Cuando GEVES creó GAIA, el sistema se contrastó además teniendo en cuenta las evaluaciones de los expertos en el examen DHE;
- c) Utilización de datos moleculares que no se ven afectados por el medio ambiente; el conjunto de marcadores y el protocolo del laboratorio están bien definidos;
- d) Utilización únicamente de caracteres fenotípicos con la robustez adecuada; posibilidad de utilizar descripciones de procedencia diversa en el marco de una cooperación más estrecha (la base de datos del maíz, creada en colaboración entre Alemania, España, Francia, y la Oficina Comunitaria de Variedades Vegetales (OCCV) de la Unión Europea, es un buen ejemplo para ilustrar el valor de este método, mediante el que distintas oficinas comparten una colección de variedades);
- e) Los caracteres obtenidos por electroforesis también puede sustituirse; y
- f) La ausencia de homogeneidad no influye en los perfiles moleculares siempre que se utilicen suficientes marcadores y el número de variantes sea bajo. Las líneas parentales del maíz presentan un alto grado de homogeneidad molecular, pero en otros cultivos podría plantearse un problema.

#### 2.2.16 *Inconvenientes*

- a) Ineficaz, o poco eficaz, con respecto a especies con variedades sintéticas o poblaciones;
- b) Es necesario disponer del número suficiente de marcadores adecuados de ADN y un número suficiente de caracteres fenotípicos que presenten poca susceptibilidad al medio ambiente; y
- c) Trabajo preliminar de comparación respecto de la evaluación de la distinción por expertos en el examen DHE.

#### Ejemplo 2: Selección genética de variedades similares para el primer ciclo de cultivo

2.2.17 Este método incluye una fase de comprobación de la similitud genética antes del primer ciclo de cultivo.

2.2.18 En aquellos casos en que la duración mínima de los ensayos sea normalmente de dos ciclos de cultivo, se seleccionan de la colección de variedades las que son genéticamente similares a fin de compararlas con las variedades candidatas en el primer ciclo de cultivo. En la fase siguiente, se utiliza la información suministrada por el solicitante en el cuestionario técnico para comprobar si alguna variedad genéticamente similar presenta diferencias en los caracteres DHE y, por tanto, no es necesario compararla en el ensayo de cultivo.

2.2.19 Sobre la base de la descripción de los caracteres DHE de la variedad elaborada en el primer ciclo de cultivo, se realiza otra búsqueda en la colección para encontrar variedades similares que no se hayan comparado en ese primer ciclo y deban compararse con la variedad candidata en el segundo ciclo.

2.2.20 En los párrafos 2.2.21 a 2.2.31 se ofrece un ejemplo, elaborado por expertos del Reino de los Países Bajos, de la selección genética de variedades similares para el primer ciclo de cultivo en el caso de la judía común.

#### Introducción

2.2.21 Este método incluye una fase de comprobación de la similitud genética antes del primer ciclo de cultivo.

2.2.22 En aquellos casos en que la duración mínima de los ensayos sea normalmente de dos ciclos de cultivo, se seleccionan de la colección de variedades las que son genéticamente similares a fin de compararlas con las variedades candidatas en el primer ciclo de cultivo. En la fase siguiente, se utiliza la información suministrada por el solicitante en el cuestionario técnico para comprobar si alguna variedad genéticamente similar presenta diferencias en los caracteres DHE y, por tanto, no es necesario compararla en el ensayo de cultivo.

2.2.23 Sobre la base de la descripción de los caracteres DHE de la variedad elaborada en el primer ciclo de cultivo, se realiza otra búsqueda en la colección para encontrar variedades similares que no se hayan comparado en ese primer ciclo y deban compararse con la variedad candidata en el segundo ciclo.

#### Procedimiento

##### *Determinación de la similitud genética*

2.2.24 En cuanto se recibe el material vegetal, se obtiene el perfil de ADN de la variedad candidata.

2.2.25 El perfil de ADN se compara con los perfiles de todas las variedades que figuran en la colección de variedades y se seleccionan las que presentan similitud genética.

##### *Información del cuestionario técnico*

2.2.26 A continuación, se utiliza la información suministrada por el solicitante en el cuestionario técnico para comprobar si alguna variedad genéticamente similar presenta claras diferencias respecto de los caracteres DHE, en cuyo caso no será necesario compararla con las variedades candidatas en el ensayo de cultivo.

## *Ensayo de campo*

### Primer ciclo de cultivo

2.2.27 Las variedades candidatas y las genéticamente similares seleccionadas mediante el procedimiento descrito se cultivan en un mismo ensayo de campo. Se elabora una completa descripción de los caracteres DHE de la variedad candidata y se compara con las descripciones de todas las variedades de la colección por medio de una base de datos que contiene descripciones elaboradas en el mismo lugar en años anteriores.

#### *Resultados posibles:*

2.2.28 Si la variedad candidata no es distinta de las variedades genéticamente similares en lo que respecta a los caracteres DHE, se continuará con el ensayo en otro ciclo de cultivo.

2.2.29 En cualquier caso, la descripción de la variedad candidata elaborada en el primer ciclo de cultivo se compara con las descripciones de las variedades de la colección por medio de una base de datos que contiene descripciones elaboradas en el mismo lugar.

a) Si, al final del primer ciclo de cultivo, se determina que la variedad candidata es distinta de todas las variedades cultivadas en ese primer ciclo y de todas las demás variedades de la colección y que reúne los requisitos de homogeneidad y estabilidad, puede concluirse el examen DHE cuando termine el primer ciclo de cultivo.

b) En todos los demás casos, deberá llevarse a cabo un segundo ciclo de cultivo.

### Segundo ciclo de cultivo

2.2.30 En el segundo ciclo, se cultiva la variedad candidata junto con todas aquellas variedades de la colección respecto de las cuales se ha determinado que no es distinta al final del primer ciclo de cultivo.

2.2.31 Al término del segundo ciclo de cultivo se efectúa una evaluación de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad. Si no es posible adoptar entonces una decisión acerca de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad, puede llevarse a cabo un nuevo ciclo de cultivo.

## **3. DIRECTRICES PARA LA VALIDACIÓN DE UN NUEVO PROTOCOLO DE MARCADORES MOLECULARES LIGADOS A CARACTERES COMO MÉTODO ALTERNATIVO DE OBSERVACIÓN**

### **3.1 Objetivos de las presentes directrices**

3.1.1 El propósito de las presentes directrices es ofrecer orientación práctica para la validación armonizada de un nuevo método basado en el modelo de aplicación “marcadores moleculares ligados a caracteres” antes de su utilización como método alternativo de observación (véase la sección 2.1 de este documento). Se describen los criterios de desempeño necesarios para la validación y se ofrece orientación sobre su evaluación. Las presentes directrices describen asimismo un protocolo estándar y un estudio de seguimiento.

3.1.2 Si se utiliza una técnica diferente, el laboratorio deberá validar su método comparándolo con el método de referencia, a fin de demostrar que la técnica alternativa produce los mismos resultados.

### **3.2 Ámbito de aplicación de las presentes directrices**

- Todos los cultivos
- Marcadores moleculares ligados a caracteres
- Para el examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad (DHE).

### **3.3 Criterios de desempeño de un nuevo protocolo basado en marcadores moleculares**

#### Especificidad

##### *Definición*

3.3.1 La especificidad se define como la correlación entre el genotipo y el fenotipo, es decir, la fiabilidad del vínculo entre el marcador y el carácter.

##### *Requisito*

3.3.4 La correlación entre el genotipo y el fenotipo debe ser del 100%. Si la correlación es inferior al 100%, deberán realizarse análisis de seguimiento para garantizar la fiabilidad de los resultados. En ese caso, puede utilizarse una regla de decisión. Una correlación inferior al 100% puede deberse a otros factores genéticos.

##### *¿Cómo evaluarla?*

3.3.5 Número de variedades: Para iniciar el proceso de selección de marcadores, se necesita un número adecuado de variedades (conjunto de desarrollo) que refleje, en la medida de lo posible, la diversidad observada dentro del grupo, cultivo, especie o tipo para el que se pretende utilizar los marcadores con fines de discriminación.

3.3.6 Las variedades deberán representar los distintos niveles de expresión e incluir, si se conocen, variedades en estado heterocigótico y homocigótico, y proceder de distintos obtentores, presentar distintos antecedentes genéticos respecto del carácter y representar distintos tipos. Cuando estén disponibles, deberán utilizarse variedades bien caracterizadas fenotípicamente para el carácter de interés.

3.3.7 Número de plantas por variedad: Deberá evaluarse al menos una planta por variedad si las variedades disponibles están bien caracterizadas fenotípicamente. En caso contrario, el número de plantas deberá ser el mismo que el previsto para la observación morfológica descrita en las directrices de examen de la UPOV.

3.3.8 La especificidad puede evaluarse en un solo laboratorio.

#### Sensibilidad y límite de detección

##### *Definición*

3.3.9 El límite de detección se define como la cantidad mínima de la diana que puede detectarse de forma fiable.

3.3.10 En el caso de los análisis realizados en muestras compuestas (por ejemplo, una mezcla de distintas plantas de la misma variedad), la sensibilidad es crítica y deberá evaluarse. Cuando se utilicen plantas individuales, la cantidad de la diana no es crítica y este criterio de desempeño es opcional.

##### *Requisito*

3.3.11 En el caso de una muestra compuesta, el requisito consistiría en detectar al menos una planta fuera de tipo en la muestra.

##### *¿Cómo evaluarlos?*

3.3.12 La sensibilidad de la detección se comprobará con muestras artificiales obtenidas mezclando una planta fuera de tipo en una muestra compuesta.

#### Repetibilidad

##### *Definición (basada en la norma ISO 16577:2016; referencia al documento UPOV/INF/17)*

3.3.13 “Repetibilidad significa que se obtienen resultados de ensayo idénticos con el mismo método, en elementos de ensayo idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, utilizando el mismo equipo y en intervalos breves de tiempo.”

3.3.14 En los métodos cualitativos, la concordancia intralaboratorio es equivalente a la repetibilidad de los métodos cuantitativos (Langton *et al.*, 2002).

#### *Requisito*

3.3.15 Lo ideal es que se alcance el 100% de repetibilidad pero por lo general se acepta un desempeño  $\geq 90\%$ . Si se ha publicado la repetibilidad del método de referencia, la repetibilidad del método alternativo deberá ser al menos equivalente.

#### *¿Cómo evaluarla?*

3.3.16 La repetibilidad puede evaluarse en un solo laboratorio.

3.3.17 Deberán analizarse al menos tres réplicas técnicas de una misma planta (tres extracciones independientes de ADN). Deberán incluirse, como mínimo, todos los tipos de genotipo previstos.

#### Reproducibilidad

*Definición (basada en la norma ISO 16577:2016; referencia al documento UPOV/INF/17)*

3.3.18 “Reproducibilidad significa que se obtienen resultados de ensayo idénticos con el mismo método, en elementos de ensayo idénticos, en el mismo laboratorio o entre distintos laboratorios, con distintos operadores, utilizando equipos diferentes y en momentos distintos.”

3.3.19 En los métodos cualitativos, la concordancia interlaboratorio es equivalente a la reproducibilidad de los métodos cuantitativos (Langton *et al.*, 2002).

#### *Requisito*

3.3.20 Lo ideal es que se alcance el 100% de reproducibilidad pero por lo general se acepta un desempeño  $\geq 90\%$ . Si se ha publicado la reproducibilidad del método de referencia, la reproducibilidad del método alternativo deberá ser al menos equivalente.

#### *¿Cómo evaluarla?*

3.3.21 La reproducibilidad deberá evaluarse entre distintos laboratorios mediante un estudio de validación interlaboratorios (ensayo interlaboratorios) con muestras codificadas de genotipos conocidos. Deberán incluirse todos los tipos de genotipo previstos.

3.3.22 El ensayo interlaboratorios deberá contar, como mínimo, con tres laboratorios diferentes, incluidos al menos dos servicios de examen distintos. Si es posible, deberán participar laboratorios con experiencia y familiarizados con la especie y la técnica. De no ser así, podrá organizarse una capacitación antes del ensayo interlaboratorios utilizando muestras sin codificar. Los laboratorios podrán participar en el ensayo interlaboratorios de forma voluntaria. Si no hubiera voluntarios, podrá realizarse una evaluación de la reproducibilidad intralaboratorio con distintos operadores.

3.3.23 Todos los laboratorios deberán seguir el protocolo que se vaya a validar. El equipo de validación podrá definir las partes estándar y facultativas del protocolo. Los laboratorios podrán participar en el ensayo interlaboratorios de forma voluntaria. Si no hubiera voluntarios, la reproducibilidad podrá determinarse en un solo laboratorio.

3.3.24 Número de variedades: Deberán incluirse, como mínimo, todos los tipos de genotipo previstos.

3.3.25 Podrán seguirse directrices o normas sobre estudios interlaboratorios, como por ejemplo la norma ISO 13495, *Foodstuffs - Principles of selection and criteria of validation for varietal identification methods using specific nucleic acid*; la norma ISO 17043, *Conformity assessment - General requirements for proficiency testing*; la norma EPPO PM 7/122-2, *Guidelines for the organization of interlaboratory comparisons by plant pest diagnostic laboratories*; o la norma ISTA TCOM-P-10, *Validation of seed health methods and organization and analysis of interlaboratory comparative tests (CT)*. El equipo de validación deberá citar en su informe las directrices seguidas.

## Robustez

*Definición (basada en la norma ISO 16577:2016; referencia a UPOV/INF/17)*

3.3.26 “La robustez es una medida de la capacidad de un método para no verse afectado por pequeñas desviaciones deliberadas con respecto a las condiciones experimentales descritas en los parámetros del procedimiento, que proporciona una indicación de su fiabilidad durante el uso normal” (por ejemplo, cambio del método de extracción de ADN o cambio de equipo de PCR en tiempo real).

### *Requisito*

3.3.27 Lo ideal es que se alcance el 100% de robustez. Menos del 100% significa que el método no es robusto frente al cambio de un parámetro, y dicho parámetro deberá indicarse en el protocolo como etapa obligatoria (por ejemplo, un cambio de mezcla maestra que sea crítico).

### *¿Cómo evaluarla?*

3.3.28 La evaluación específica de la robustez es opcional. La robustez se evalúa parcialmente durante el ensayo interlaboratorios (reproducibilidad), mediante el uso de distintos laboratorios, equipos, aparatos, etc.

## **3.4 Informe de validación**

3.4.1 El informe de validación y los resultados deberán ser objeto de una revisión por pares realizada por dos de los organismos responsables, preferiblemente tres si la reproducibilidad se evaluó en un solo laboratorio. La revisión se realizará de forma voluntaria, pero preferiblemente deberá llevarla a cabo un laboratorio familiarizado con la especie y el método.

3.4.2 Durante el proceso de revisión, los revisores podrán solicitar datos de validación adicionales en consulta con el equipo de validación.

### Contenido del informe de validación

- Datos brutos generados durante las distintas etapas del proceso de validación
- Protocolo detallado con indicación de las etapas estándar y facultativas
- Evaluación de los criterios de desempeño
- Conclusión

### Publicidad

3.4.3 El informe de validación deberá estar disponible previa solicitud. En el nuevo protocolo deberá mencionarse el proceso de validación e indicarse el servicio de examen de contacto.

## **3.5 Protocolo estándar para marcadores moleculares ligados a caracteres**

3.5.1 Los elementos estándar se indican en la columna “información esencial”; los demás elementos pueden utilizarse en función de los caracteres relacionados con el protocolo de examen. Si un laboratorio desea modificar un capítulo estándar, deberá validar su método comparándolo con el método de referencia.

Cuadro 1: Protocolo estándar para marcadores moleculares ligados a caracteres como método alternativo de observación

| Capítulo | Elementos de un protocolo estándar de marcadores moleculares ligados a caracteres | Información esencial para la armonización | Observación                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1        | Carácter                                                                          | Sí                                        | Nombre del carácter.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 2        | Genes y alelos                                                                    | Sí                                        | Deberán evitarse los marcadores dominantes o los marcadores de presencia/ausencia; de lo contrario, deberá evaluarse la robustez.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 2.1      | Gen o genes diana                                                                 | Sí                                        | a) archivo(s) que contienen la información sobre la secuencia de ADN (orden de los nucleótidos).<br>b) referencia a información sobre ADN en bases de datos públicas (como GenBank).<br>c) referencia a publicaciones en las que se revele la información sobre la secuencia de ADN de los niveles de expresión del carácter.<br>d) referencia a una posición particular en la versión publicada del genoma de referencia.                                                                       |
| 2.2      | Alelo correspondiente al nivel de expresión 1                                     | Sí                                        | a) archivo(s) que contienen la información sobre la secuencia de ADN (orden de los nucleótidos).<br>b) referencia a información sobre ADN en bases de datos públicas (como GenBank).<br>c) referencia a publicaciones en las que se revele la información sobre la secuencia de ADN de los niveles de expresión del carácter.<br>d) referencia a una posición particular en la versión publicada del genoma de referencia, en combinación con el SNP o INDEL responsable del nivel de expresión. |
| 2.3      | Alelo correspondiente al nivel de expresión n                                     | Sí                                        | a) archivo(s) que contienen la información sobre la secuencia de ADN (orden de los nucleótidos).<br>b) referencia a información sobre ADN en bases de datos públicas (como GenBank).<br>c) referencia a publicaciones en las que se revele la información sobre la secuencia de ADN de los niveles de expresión del carácter.<br>d) referencia a una posición particular en la versión publicada del genoma de referencia, en combinación con el SNP o INDEL responsable del nivel de expresión. |
| 3        | Cebadores (y sondas)                                                              | Sí                                        | Secuencias de cebadores y sondas, referencias a accesiones y secuencias en bases de datos públicas (números GenBank), bibliografía.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 3.1      | Cebadores (y sondas) para detectar el alelo 'g'                                   | Sí                                        | Secuencias de cebadores correspondientes al alelo o alelos para el nivel de expresión 'g' (resistencia).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 3.2      | Cebadores (y sondas) para detectar el alelo '1'                                   | Sí                                        | Secuencias de cebadores correspondientes al alelo o alelos para el nivel de expresión '1' (susceptibilidad).                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 3.3      | Cebadores (y sondas) para detectar el alelo 'x'                                   | Sí                                        | Secuencias de cebadores correspondientes al alelo o alelos para el nivel de expresión 'x'.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |

| Capítulo | Elementos de un protocolo estándar de marcadores moleculares ligados a caracteres | Información esencial para la armonización | Observación                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4        | Formato del examen                                                                |                                           |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 4.1      | Número de plantas por genotipo                                                    | SÍ                                        | Se exige un número mínimo de plantas individuales: el examen del marcador se realiza en el mismo número de plantas individuales y aplicando los mismos criterios de distinción, homogeneidad y estabilidad que en el examen del carácter mediante un ensayo de observación (documentos TGP/9 y TGP/10).                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| 4.2      | Variedades control                                                                | SÍ                                        | Deberán utilizarse variedades control (las mismas que en el ensayo de observación) como patrones que representen todas las combinaciones pertinentes de alelos. Por ejemplo, podrán ser homocigóticas para el alelo correspondiente al nivel de expresión 9 (presente), homocigóticas para el alelo correspondiente al nivel de expresión 1 (ausente) o heterocigóticas (ambos alelos presentes en un diploide), y podrán corresponder a resistencia, susceptibilidad o resistencia intermedia de la variedad (según la función del gen; dominante/recesivo). Los controles de ADN pueden utilizarse directamente. |
| 4.3      | Controles del proceso                                                             | SÍ                                        | a) Controles negativos del proceso.<br>b) Controles positivos de ADN, que pueden ser las variedades control.<br>c) Control interno de amplificación en el caso de un marcador de presencia/ausencia (un marcador dirigido al gen de citocromo oxidasa como marcador interno de amplificación).<br>d) Tampón utilizado para la extracción.                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 5        | Preparativos                                                                      | NO                                        | En función del método utilizado. No figura en las directrices de examen. Podrán proporcionarse protocolos detallados como ejemplo en un anexo o ponerse a disposición previa solicitud a la organización que desarrolló el marcador. Por lo general, se realiza un muestreo de plántulas de 4 días, seguido de una extracción de ADN mediante el método CTAB.                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 6        | Técnica del método                                                                | SÍ                                        | PCR convencional, TETRA-ARMS, qPCR, KASP, secuenciación de amplicones.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 6.1      | Condiciones particulares                                                          | NO                                        | En función del método utilizado. No figura en las directrices de examen. Podrán proporcionarse protocolos detallados como ejemplo en un anexo o ponerse a disposición previa solicitud al instituto que desarrolló el marcador. Deberá incluirse un protocolo de PCR que describa las concentraciones de cebadores, enzima y dNTP, así como el esquema de ciclos de PCR.                                                                                                                                                                                                                                           |
| 6.2      | Equipo o infraestructura específicos                                              | NO                                        | En función del método utilizado. No figura en las directrices de examen. Podrán proporcionarse protocolos detallados como ejemplo en un anexo o ponerse a disposición previa solicitud al instituto que desarrolló el marcador.<br>Equipos, kits comerciales, fabricantes de componentes y números de lote de los productos químicos.                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 7        | Observaciones                                                                     | NO                                        | En función del método utilizado. No figura en las directrices de examen. Podrán proporcionarse protocolos detallados como ejemplo en un anexo o ponerse a disposición previa solicitud al instituto que desarrolló el marcador. Las observaciones pueden consistir en bandas en gel de agarosa (PCR convencional), valores Ct (qPCR) o identificación de variantes basada en lecturas de secuenciación.                                                                                                                                                                                                            |

| Capítulo | Elementos de un protocolo estándar de marcadores moleculares ligados a caracteres | Información esencial para la armonización | Observación                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7.1      | Validez de los resultados                                                         | Sí                                        | En función del método utilizado. En el caso de la qPCR, deberá comprobarse que las curvas presenten la forma característica de amplificación exponencial. Deberá comprobarse que los controles se comporten según lo esperado (controles negativos = ausencia de señal; controles positivos = señales esperadas para todos los fluoróforos). |
| 8        | Interpretación de los resultados del examen                                       | Sí                                        | Relación entre los alelos y los niveles de expresión, con las notas correspondientes. En caso de que el resultado del examen del marcador de ADN no confirme la declaración contenida en el cuestionario técnico, deberá realizarse un ensayo en campo o un bioensayo.                                                                       |
| 9        | Validación del protocolo                                                          | Sí                                        | Proporcionar información sobre la validación del protocolo o remitir a los usuarios al servicio de examen de contacto para obtener información adicional.                                                                                                                                                                                    |
| 9.1      | Servicio de examen de contacto                                                    | Sí                                        | Datos de contacto del instituto que desarrolló el protocolo, incluido el nombre del servicio.                                                                                                                                                                                                                                                |

3.5.2 En las directrices de examen del tomate (TG/44/12), en el carácter “Resistencia al virus del mosaico del tomate” (ToMV) (véase Ad. 59(ii), “Examen de marcadores de ADN”), se ofrece un ejemplo de “marcador molecular ligado a caracteres como método alternativo de observación”. Aunque se ajusta a las presentes orientaciones, se adoptó antes del formato de presentación estándar descrito en el Cuadro 1 y, por tanto, se presenta en un formato diferente. El informe del ensayo comparativo realizado por tres laboratorios está disponible previa solicitud a [info@naktuinbouw.nl](mailto:info@naktuinbouw.nl).

### 3.6 Estudio de seguimiento tras la aprobación

3.6.1 La validación del marcador no es definitiva, ya que pueden aparecer nuevas variaciones genéticas en las variedades comercializadas. Se trata de un proceso de evaluación continua. Tras la aceptación del protocolo validado, la especificidad deberá reevaluarse mediante ensayos paralelos (examen del marcador y bioensayo), junto con el método de observación al menos durante el primer año.

3.6.2 Tras el primer año de aceptación del protocolo, deberán realizarse comprobaciones morfológicas en aproximadamente el 10% de las nuevas variedades.

### 3.7 Bibliografía

Arens P., Mansilla C., Deinum D., Cavellini L., Moretti A., Rolland S., van der Schoot H., Calvache D., Ponz F., Collonnier C., Mathis R., Smilde D., Caranta C.; Vosman B., 2010: “Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing”. *Theoretical and Applied Genetics*, 120(3), pp. 655-64.

Langton, S.D., Chevennement, R., Nagelkerke, N. y Lombard, B. (2002). “Analysing collaborative trials for qualitative microbiological methods: accordance and concordance”. *International Journal of Food Microbiology*, 79, 175-181.