

Comité Técnico

Sexagésima sesión

Ginebra, 21 y 22 de octubre de 2024

SESSIONS/2024/6**Original:** Inglés**Fecha:** 25 de septiembre de 2024**Comité Administrativo y Jurídico**

Octogésima primera sesión

Ginebra, 23 de octubre de 2024

TÉCNICAS MOLECULARES*Documento preparado por la Oficina de la Unión**Descargo de responsabilidad: el presente documento no constituye un documento de política u orientación de la UPOV.**Este documento se ha generado mediante traducción automática y no puede garantizarse su exactitud. Por lo tanto, el texto en el idioma original es la única versión auténtica.***RESUMEN**

1. El objetivo de este documento es informar al Comité Técnico (TC) y al Comité Administrativo y Jurídico (CAJ) sobre los avances relativos a las técnicas moleculares.

2. Se invita al TC a:

(a) solicitar a los Grupos de Trabajo Técnico (TWP) que, en sus reuniones de 2025, examinen la propuesta de directrices para la validación de un nuevo protocolo de marcadores moleculares específicos de caracteres para el examen DHE, que figura en el Anexo del presente documento;

(b) tomar nota de la petición de las organizaciones de obtentores de que se elaboren orientaciones en la UPOV sobre la confidencialidad de los datos moleculares y del ofrecimiento de proponer un proyecto de modelo de acuerdo, que se presentará en la tercera sesión del Grupo de Trabajo Técnico sobre Métodos y Técnicas de Examen (TWM); y

(c) tomar nota de los elementos informativos que figuran en el presente documento.

3. En este documento se utilizan las siguientes abreviaturas:

CAJ:	Comité Administrativo y Jurídico
ISTA:	International Seed Testing Association
OCDE:	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
TC:	Comité Técnico
TWA:	Grupo de Trabajo Técnico sobre Plantas Agrícolas
TWF:	Grupo de Trabajo Técnico sobre Plantas Frutales
TWM:	Grupo de Trabajo Técnico sobre Métodos y Técnicas de Examen
TWO:	Grupo de Trabajo Técnico sobre Plantas Ornamentales y Árboles Forestales
TWP:	Grupo(s) de Trabajo Técnico(s)
TWV:	Grupo de Trabajo Técnico sobre Hortalizas

4. La estructura de este documento es la siguiente:

DIRECTRICES PARA LA VALIDACIÓN DE UN NUEVO PROTOCOLO DE MARCADORES MOLECULARES ESPECÍFICOS DE CARACTERES COMO MÉTODO ALTERNATIVO DE OBSERVACIÓN.....	2
Antecedentes.....	3
Novedades acontecidas en los Grupos de Trabajo Técnico en sus sesiones de 2024	3
<i>Grupo de Trabajo Técnico sobre Métodos y Técnicas de Examen (TWM)</i>	3
CUESTIONES PARA INFORMACIÓN.....	4
Novedades acontecidas en la segunda reunión del Grupo de Trabajo Técnico sobre Métodos y Técnicas de Examen (TWM).....	4
Avances en técnicas moleculares y bioinformática	4
<i>Últimos avances en técnicas moleculares y bioinformática</i>	4
<i>Cooperación entre organizaciones internacionales</i>	4
<i>Informe sobre los trabajos relativos a las técnicas moleculares en relación con el examen DHE</i>	4
<i>El uso de técnicas moleculares en la identificación de variedades</i>	6
ANEXO: Directrices para la validación de un nuevo protocolo de marcadores moleculares específicos de características para estudios DHE como método alternativo de observación".	

DIRECTRICES PARA LA VALIDACIÓN DE UN NUEVO PROTOCOLO DE MARCADORES MOLECULARES ESPECÍFICOS DE CARACTERES COMO MÉTODO ALTERNATIVO DE OBSERVACIÓN

5. El TWM¹, en su segunda sesión, recibió una ponencia de la Sra. Amandine LeVan (Francia) sobre "Directrices para la validación de un nuevo protocolo de marcadores moleculares específicos de caracteres para estudios DHE como método alternativo de observación", de la que se proporciona copia en el documento TWM/2/17. El TWM tomó nota de que las propuestas formuladas durante la ponencia serán examinadas por el TWV e informadas al TC en sus sesiones de 2024.

6. El TWV², en su quincuagésima octava sesión, examinó el documento TWV/58/9, presentado por un experto de los Países Bajos (Reino de). El documento TWV/58/9 se reproduce en el Anexo del presente documento.

7. El TWV convino en que las orientaciones sobre la evaluación de caracteres mediante marcadores moleculares presentadas en las directrices de examen se beneficiarían de la armonización internacional.

8. El TWV acordó proponer la supresión de la última frase del apartado 5 y la inclusión de una referencia a las respectivas orientaciones de la UPOV aplicables a las normas ISO mencionadas.

9. El TWV acordó proponer que se modifique la información proporcionada en el cuadro del protocolo, punto 8, para aclarar que "en caso de que el resultado de la prueba del marcador de ADN no confirme la declaración del Cuestionario Técnico, deberá realizarse un ensayo de campo o un bioensayo para evaluar si la declaración del Cuestionario Técnico es correcta".

10. El TWV tomó nota de que los obtentores podían utilizar marcadores moleculares específicos para cada carácter y convino en que tenían derecho a informar al examinador sobre el método de evaluación utilizado para evaluar los caracteres en el Cuestionario Técnico, en los casos en que se dispusiera de un marcador molecular alternativo al indicado en el Cuestionario Técnico.

11. *Se invita al TC a solicitar a los TWP que, en sus reuniones de 2025, examinen la propuesta de directrices para la validación de un nuevo protocolo de marcadores moleculares específicos de caracteres para el examen DHE, que figura en el Anexo del presente documento.*

¹ TWM, segunda sesión, celebrada por medios electrónicos, del 8 al 11 de abril de 2024. Véase el documento TWM/2/21 "Informe", párrafos 57 a 61.

² TWV, quincuagésima octava sesión, celebrada por medios electrónicos, del 22 al 25 de abril de 2024. Véase el documento TWV//58/11 "Informe", párrafos 54 a 58.

CONFIDENCIALIDAD Y PROPIEDAD DE LA INFORMACIÓN MOLECULAR

Antecedentes

12. El TC, en su quincuagésima octava sesión³, tomó nota de los debates mantenidos en los TWP, en sus sesiones de 2022, sobre "Confidencialidad y propiedad de la información molecular". El TC tomó nota de las preocupaciones expresadas por las organizaciones de obtentores en el TWM en el sentido de que la información molecular utilizada durante el examen de una variedad no debe ser compartida por la autoridad que recibió la solicitud sin el permiso del obtentor. El TC convino en invitar a los miembros y observadores a informar sobre las políticas vigentes en materia de confidencialidad de la información molecular en los TWP, en sus sesiones de 2023 (véase el documento TC/58/31 "Informe", párrafos 48 a 50).

13. El TC, en su quincuagésima novena sesión⁴, tomó nota de las políticas sobre las que se ha informado y de los debates sobre la confidencialidad de la información molecular en las sesiones de los TWP de 2023. El TC convino en reiterar la invitación a los miembros y observadores para que informen sobre las políticas existentes en materia de confidencialidad de la información molecular en los TWP, en sus sesiones de 2024.

14. En el documento SESSIONS/2023/5 "Técnicas moleculares" se ofrecen más antecedentes sobre este asunto.

Novedades acontecidas en los Grupos de Trabajo Técnicos en sus sesiones de 2024

15. En sus reuniones de 2024, se invitó a los TWP a presentar ponencias e informar sobre ejemplos de políticas sobre confidencialidad y acceso a datos moleculares. En el TWA, el TWF, el TWO y el TWV no se informó sobre las políticas existentes en materia de confidencialidad.

Grupo de Trabajo Técnico sobre Métodos y Técnicas de Examen (TWM)

16. El TWM⁵ recibió una ponencia sobre "Confidencialidad de la información molecular" del Sr. Marcel Bruins, de CropLife International, en nombre de la African Seed Trade Association (AFSTA), la Asia and Pacific Seed Association (APSA), la Comunidad Internacional de Fitomejoradores de Plantas Hortícolas de Reproducción Asexuada (CIOPORA), CropLife International, Euroseeds, la International Seed Federation (ISF) y la Asociación de Semillas de las Américas (SAA) ("organizaciones de obtentores"). En el documento TWM/2/7 figura una copia de la ponencia.

17. El TWM tomó nota de la petición de las organizaciones de obtentores de que se elaboren orientaciones en la UPOV sobre la confidencialidad de los datos moleculares y del ofrecimiento de proponer un proyecto de modelo de acuerdo, que se presentará en su tercera reunión.

Ejemplos de políticas de confidencialidad y acceso a datos de información molecular

18. El TWM señaló que se espera que la Unión Europea adopte una política sobre el acceso a las muestras de variedades vegetales, incluidas las muestras de ADN, de la que se informará en los TWP en 2024.

19. El TWM acordó invitar a los miembros de la UPOV a que informen en su tercera reunión sobre las políticas existentes en materia de confidencialidad de la información molecular.

20. Se invita al TC a tomar nota de la solicitud de las organizaciones de obtentores de que se elaboren orientaciones en la UPOV sobre la confidencialidad de los datos moleculares y del ofrecimiento de proponer un proyecto de modelo de acuerdo, que se presentará en la tercera sesión del TWM.

³ TC, quincuagésima octava sesión, celebrada en Ginebra, los días 24 y 25 de octubre de 2022.

⁴ TC, quincuagésima novena sesión, celebrada en Ginebra, los días 23 y 24 de octubre de 2023.

⁵ TWM, segunda sesión, celebrada por medios electrónicos, del 8 al 11 de abril de 2024. Véase el documento TWM/2/21 "Informe", párrafos 57 a 61.

CUESTIONES PARA INFORMACIÓN

Novedades acontecidas en la segunda reunión del Grupo de Trabajo Técnico sobre Métodos y Técnicas de Examen (TWM)

21. El TWM celebró su segunda reunión por medios electrónicos del 8 al 11 de abril de 2024. En las secciones siguientes se informa de las novedades sobre técnicas moleculares.

Avances en técnicas moleculares y bioinformática*Últimos avances en técnicas moleculares y bioinformática*Norma ST.26 de la OMPI - Secuencia de la OMPI

22. El TWM escuchó una ponencia de la Sra. Emma Francis, de la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI), sobre la "Norma ST.26 de la OMPI - Secuencia de la OMPI", de la que se proporciona copia en el documento TWM/2/15.

23. El TWM señaló que podrían elaborarse algoritmos de búsqueda para bases de datos que contengan información sobre nucleótidos o aminoácidos utilizando el formato de datos ST.26 estándar de la OMPI, incluidos los datos sobre variedades vegetales.

*Cooperación entre organizaciones internacionales*OCDE

24. El TWM recibió una ponencia del Sr. Csaba Gaspar, de la Organización de Cooperación y de Desarrollo Económicos (OCDE), sobre "Últimas novedades en la aplicación de BMT en el marco de los Sistemas de Semillas de la OCDE", de la que se facilita copia en el documento TWM/2/19.

25. El TWM tomó nota de la utilización de técnicas moleculares en los Sistemas de Semillas de la OCDE como procedimiento complementario para la identificación de variedades en los ensayos de campo.

26. El TWM señaló que la OCDE estaba estudiando la evaluación de caracteres mediante el análisis de imágenes y que se preveía considerar en el futuro el uso de algoritmos de inteligencia artificial.

ISTA

27. El TWM escuchó una ponencia de la Sra. Ana Laura Vicario, de la International Seed Testing Association (ISTA), sobre el "Informe de la ISTA sobre la utilización de técnicas moleculares", del que se proporciona copia en el documento TWM/2/18.

28. El TWM tomó nota de la invitación a los expertos interesados a unirse a las actividades del Comité de Variedades de la ISTA.

29. El TWM dio las gracias a la OCDE y a la ISTA por informar sobre los avances en el uso de técnicas moleculares en sus respectivas organizaciones.

30. El TWM tomó nota de la invitación de la UPOV para la organización conjunta de un taller de la OCDE, la ISTA y la UPOV en el futuro, a fin de debatir la utilización de técnicas moleculares en cada organización y explorar una mayor colaboración en este ámbito.

*Informe sobre los trabajos relativos a las técnicas moleculares en relación con el examen DHE*Gestión de colecciones de referencia mediante marcadores moleculares: un nuevo enfoque basado en la predicción genómica

31. El TWM examinó el documento TWM/2/4 y escuchó una ponencia del Sr. Adrian Roberts (Reino Unido) sobre "Predicción genómica para la gestión de colecciones de referencia", cuya copia se reproduce en el documento TWM/2/4 Add.

32. El TWM observó que el método de predicción genómica tenía por objeto establecer vínculos entre los marcadores moleculares y la expresión fenotípica de los caracteres en las variedades de ray-grass, y que podría ayudar a la gestión de las colecciones de variedades.

33. El TWM señaló que el método de predicción genómica se había desarrollado utilizando datos de un único lugar de ensayo y que se seguiría evaluando en otros cultivos en los que se dispusiera de datos de diferentes lugares.

Evaluación de la uniformidad mediante marcadores moleculares

34. El TWM examinó el documento TWM/2/5 y escuchó una ponencia del Sr. Adrian Roberts (Reino Unido) sobre "Evaluación de la homogeneidad mediante marcadores moleculares", cuya copia se reproduce en el documento TWM/2/5 Add.

35. El TWM observó que la investigación se había llevado a cabo evaluando la variabilidad genética de un cultivo alógamo (ray-grass) con caracteres medidos y no probados en caracteres pseudocualitativos.

36. El TWM señaló que en los próximos pasos de la investigación se podría investigar el error de medición asociado a la metodología de secuenciación mediante ejecuciones independientes con la misma muestra conjunta.

Enfoques moleculares para apoyar el examen DHE

37. El TWM examinó el documento TWM/2/6 y escuchó una ponencia de la Sra. Vanessa McMillan (Reino Unido) sobre "Enfoques moleculares en apoyo del examen DHE", cuya copia se reproduce en el documento TWM/2/6 Add.

38. El TWM tomó nota de que se había logrado hasta un 75% de correlación marcador-rasgo en variedades de cebada, aunque no en relación con los caracteres DHE. El TWM tomó nota de la intención de publicar los marcadores moleculares identificados en el proyecto, que también podrían utilizarse para autenticar nuevas semillas de variedades. El TWM acordó invitar al experto del Reino Unido a que informe sobre los progresos realizados en su tercera reunión.

Actividades de I+D de la OCVV

39. El TWM escuchó una ponencia de la Sra. Cécile Collonnier (Unión Europea) sobre las "Actividades de I+D de la OCVV", de la que se facilita copia en el documento TWM/2/12.

40. El TWM tomó nota de las aportaciones de los distintos proyectos presentados, en particular del proyecto INVITE, que finalizará en 2024.

Maíz6H-60K: Una matriz de polimorfismos de nucleótido único para todo el genoma y su aplicación

41. El TWM recibió una ponencia de la Sra. Hongli Tian (China) sobre "Maize6H-60K: Una matriz de polimorfismos de nucleótido único para todo el genoma y su aplicación", de la que se proporciona copia en el documento TWM/2/16.

42. El TWM observó que el 21% de los SNP de la matriz estaban situados en regiones codificantes del genoma, aunque aún no se había identificado su relación con la expresión de los caracteres.

Directrices para la validación de un nuevo protocolo de marcadores moleculares específicos para estudios DHE como método alternativo de observación

43. El TWM escuchó una ponencia de la Sra. Amandine LeVan (Francia) sobre "Directrices para la validación de un nuevo protocolo de marcadores moleculares específicos de caracteres para estudios DHE como método alternativo de observación", cuya copia figura en el documento TWM/2/17.

44. El TWM señaló que la propuesta sería examinada por el TWV e informada al TC, en sus sesiones de 2024.

El uso de técnicas moleculares en la identificación de variedades

Uso de marcadores basados en inteligencia artificial para la trazabilidad de variedades

45. El TWM escuchó una ponencia de la Sra. Ana Laura Vicario (Argentina) sobre la "Utilización de marcadores basados en la inteligencia artificial para la rastreabilidad de las variedades", de la que se facilita copia en el documento TWM/2/9.

46. El TWM señaló que la tecnología se utiliza en los procedimientos rutinarios de control del mercado y trazabilidad de las variedades de cebada y trigo en Argentina. El TWM tomó nota de que la tecnología se estaba desarrollando para las variedades de soja.

47. El TWM observó que el algoritmo utilizado establece patrones únicos para cada variedad basándose en la morfología de las semillas. El TWM observó que los umbrales para la toma de decisiones y el error aceptado podrían ajustarse para permitir el análisis de la pureza de las variedades.

LociScan, una herramienta de selección de combinaciones de marcadores genéticos para la discriminación de variedades vegetales

48. El TWM asistió a una ponencia del Sr. Yang Yang (China) sobre "LociScan, una herramienta de selección de combinaciones de marcadores genéticos para la discriminación de variedades vegetales", cuya copia figura en el documento TWM/2/14.

49. El TWM señaló que la herramienta informática LociScan identifica combinaciones de conjuntos de marcadores para optimizar el número de marcadores necesarios para discriminar las variedades. El TWM señaló que el tiempo de análisis requerido por la herramienta dependerá del número de muestras procesadas y no del número de marcadores utilizados.

50. El TWM tomó nota de que la herramienta informática LociScan estaba disponible para ser probada y acordó invitar a los expertos interesados a probar la herramienta e informar de los resultados al experto de China.

51. Se invita al TC y al CAJ a tomar nota de las cuestiones informativas que figuran en el presente documento.

[Sigue el anexo]

EXTRACTO DEL DOCUMENTO TWV/58/9

DIRECTRICES PARA LA VALIDACIÓN DE UN NUEVO PROTOCOLO DE MARCADORES MOLECULARES ESPECÍFICOS DE CARACTERES COMO MÉTODO ALTERNATIVO DE OBSERVACIÓN

Documento elaborado por expertos de Francia, Italia y el Reino de los Países Bajos

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

DOCUMENTOS ASOCIADOS	1
I. OBJETIVOS DE ESTAS DIRECTRICES	2
II. ÁMBITO DE APLICACIÓN DE LAS PRESENTES DIRECTRICES	2
III. CRITERIOS DE FUNCIONAMIENTO DE UN NUEVO PROTOCOLO BASADO EN MARCADORES MOLECULARES	2
Especificidad	2
Definición	2
Requisito	2
Cómo evaluarlo	2
Sensibilidad y límite de detección	2
Definición	2
Requisito	3
Repetibilidad	3
Definición (basada en ISO 16 577:2016)	3
Requisito	3
¿Cómo evaluarlo?	3
Reproducibilidad	3
Definición (basada en ISO 16 577:2016)	3
Requisito	3
¿Cómo evaluarlo?	3
Robustez	4
Definición	4
Requisito	4
¿Cómo evaluarlo?	4
IV. INFORME DE VALIDACIÓN	4
Contenido del informe de validación	4
Publicidad	4
V. PROTOCOLO ESTÁNDAR PARA EL PROTOCOLO DE MARCADORES MOLECULARES ESPECÍFICOS DE CARACTERÍSTICAS	4
VI. ENCUESTA DE SEGUIMIENTO TRAS LA APROBACIÓN	7

DOCUMENTOS ASOCIADOS

1. Tenga en cuenta que las partes resaltadas indican texto citado de los documentos que figuran a continuación:

- TG/1/3: Introducción general al examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad y a la elaboración de descripciones armonizadas de las obtenciones vegetales
- TG/44: Directrices para la realización de los ensayos de distinción, homogeneidad y estabilidad del tomate
- TGP/12: Orientaciones sobre ciertos caracteres fisiológicos
- TGP/15: Orientación sobre el uso de marcadores bioquímicos y moleculares en el examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad (DHE)
- **UPOV/INF/17 Directrices para los perfiles de ADN: selección de marcadores moleculares y creación de una base de datos**
- UPOV/INF/18 Posibilidad de utilizar marcadores moleculares en el examen de la distinción, homogeneidad y estabilidad (DUS)
- TWV/54/7 + Add Utilización de técnicas moleculares en el examen DHE

I. OBJETIVOS DE ESTAS DIRECTRICES

2. El propósito de estas directrices es elaborar los principios contenidos en la Introducción General (documento TG/1/3), y sus documentos TGP asociados, en una guía práctica detallada para la validación armonizada de un nuevo método basado en un marcador molecular antes de su uso como prueba alternativa. Se describen los criterios de rendimiento necesarios para la validación y se ofrecen orientaciones sobre su evaluación. Estas directrices también describen un protocolo estándar con capítulos obligatorios y opcionales. También se describe la encuesta posterior a la aceptación.

3. Si se utiliza una técnica diferente, el laboratorio debe validar su método en comparación con el método de referencia (para demostrar que la técnica alternativa da los mismos resultados).

II. ÁMBITO DE APLICACIÓN DE LAS PRESENTES DIRECTRICES

Todos los cultivos

Marcadores moleculares específicos de las características

Para el examen de Distinción, Homogeneidad y Estabilidad (DHE).

III. CRITERIOS DE FUNCIONAMIENTO DE UN NUEVO PROTOCOLO BASADO EN MARCADORES MOLECULARES

Especificidad

Definición

4. Correlación entre el genotipo y el fenotipo, es decir, fiabilidad del vínculo entre el marcador y el carácter.

Requisito

5. En principio 100% de correlación entre el genotipo y el fenotipo. Si la correlación es inferior al 100%, deben realizarse una o varias pruebas 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. También puede sugerir que la no correlación no está causada por el marcador, sino por factores externos en las observaciones fenotípicas (por ejemplo, biotest para la resistencia a una enfermedad).

Cómo evaluarlo

6. Número de variedades: "**Para iniciar el proceso de selección de marcadores se necesita un número adecuado de variedades (conjunto de desarrollo) que refleje como máximo la diversidad observada dentro del grupo/cultivo/especie/tipo para el que se pretende que los marcadores sean discriminantes.**"

7. Las variedades deberán representar los diferentes niveles de expresión (si se conocen variedades con estado heterocigótico y homocigótico), proceder de diferentes empresas de semillas, con diferentes antecedentes genéticos del carácter y diferentes tipos. Deberán utilizarse variedades bien caracterizadas fenotípicamente para el carácter de interés cuando estén disponibles.

8. Número de plantas por variedad: Al menos una planta por variedad si se dispone de variedades bien caracterizadas fenotípicamente. En caso contrario, el número de plantas deberá ser el mismo que para la observación morfológica descrita en la directriz de la UPOV.

9. La especificidad puede evaluarse en un solo laboratorio.

Sensibilidad y límite de detección

Definición

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

11. En el caso de los análisis realizados en muestras a granel (por ejemplo, un conjunto de diferentes plantas de la misma variedad), la sensibilidad es crítica y debe evaluarse. Para el uso en plantas individuales, la cantidad del blanco no es crítica y este criterio de rendimiento es opcional.

Requisito

12. En el caso de un conjunto, el requisito sería detectar al menos un fuera de tipo en el conjunto.

¿Cómo evaluarlo?

13. Utilizar muestras artificiales mezclando una fuera de tipo a un conjunto para comprobar la sensibilidad de la detección.

Repetibilidad

Definición (basada en ISO 16 577:2016)

14. "Repetibilidad; cuando se obtienen resultados de ensayo idénticos con el mismo método, en elementos de ensayo idénticos, en el mismo laboratorio, por el mismo operario, utilizando el mismo equipo en intervalos cortos de tiempo."

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

Requisito

16. Idealmente el 100%, un rendimiento $\geq 90\%$ es generalmente aceptado. Si se publica la repetibilidad del método de referencia, la repetibilidad del método alternativo debe ser al menos equivalente.

¿Cómo evaluarlo?

17. La repetibilidad puede evaluarse dentro de un mismo laboratorio.

18. Al menos tres réplicas técnicas extraídas de una misma planta (tres extracciones independientes de ADN). Incluir al menos todos los tipos de genotipo esperados.

Reproducibilidad

Definición (basada en ISO 16 577:2016)

19. "Reproducibilidad; cuando los resultados de las pruebas se obtienen con el mismo método, en elementos de prueba idénticos, dentro del mismo laboratorio o entre laboratorios diferentes, con operadores diferentes, utilizando equipos diferentes" en momentos diferentes.

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

Requisito

21. Idealmente el 100%, generalmente se acepta un rendimiento $\geq 90\%$. Si se publica la reproducibilidad del método de referencia, la reproducibilidad del método alternativo debe ser al menos equivalente.

¿Cómo evaluarlo?

22. La reproducibilidad debe evaluarse entre distintos laboratorios mediante un estudio de validación interlaboratorios (Ring-test) con muestras codificadas de genotipos conocidos. Deben incluirse todos los tipos de genotipo esperados.

23. En la ring-test deberán participar al menos tres laboratorios diferentes, incluidas al menos dos oficinas de examen diferentes (por ejemplo, en el proyecto INVITE participaron 3 oficinas de examen en la prueba de validación). Si es posible, deberán participar laboratorios experimentados que conozcan la especie y la técnica. Si no, se puede organizar una formación antes del ring-test con muestras no codificadas. Los laboratorios pueden participar en un ring-test de forma voluntaria. En caso de que no haya voluntarios, la reproducibilidad puede determinarse dentro de un laboratorio.

24. Todos los laboratorios deben seguir el protocolo para ser validados. En el protocolo, el equipo de validación puede definir partes obligatorias y opcionales. Por ejemplo, véase el protocolo CPVO/TP-044/4-Rev. en el que se definieron las etapas obligatorias y opcionales.

25. Número de variedades: Incluir al menos todos los tipos de genotipo previstos.

26. Pueden seguirse las directrices/normas sobre estudios interlaboratorios: ISO 13495 *Foodstuffs - Principles of selection and criteria of validation for varietal identification methods using specific nucleic acid*, ISO 17043 *Conformity assessment - General requirements for proficiency testing*, EPPO pm7-122-2 *Guidelines for the organization of interlaboratory comparisons by plant pest diagnostic laboratories*, ISTA TCOM-P-10-*Validation of seed health methods and organization and analysis of interlaboratory comparative tests (CT)*... El equipo de validación puede citar en su informe las directrices seguidas.

Robustez

Definición

27. "Robustez; una medida de su capacidad para no verse afectado por pequeñas, pero deliberadas, desviaciones de las condiciones experimentales descritas en los parámetros del procedimiento y proporciona una indicación de su fiabilidad durante el uso normal" (por ejemplo, cambio del método de extracción de ADN o cambio de la máquina de tiempo real).

Requisito

28. Lo ideal es el 100%, si es menos significa que el método no es robusto a un cambio de un parámetro y esto debe indicarse en el protocolo como un paso obligatorio (por ejemplo, un cambio de una mezcla maestra que sería crítico).

¿Cómo evaluarlo?

29. Es opcional evaluar, y la robustez se evalúa parcialmente durante el ensayo interlaboratorios (reproducibilidad), (diferentes laboratorios, equipos, maquinaria, personas, etc.).

IV. INFORME DE VALIDACIÓN

30. El informe de validación y los resultados deben ser revisados por dos (preferiblemente 3 si la reproducibilidad se ha realizado en un solo laboratorio) de las oficinas de examen. La revisión es voluntaria, pero es preferible que la realice un laboratorio familiarizado con la especie y el método.

31. Durante el proceso de revisión, los revisores pueden exigir datos de validación adicionales en concertación con el equipo de validación.

Contenido del informe de validación

- Datos brutos generados durante las distintas fases del proceso de validación
- Protocolo detallado con pasos opcionales y obligatorios definidos
- Evaluación de los criterios de rendimiento
- Conclusión

Publicidad

32. El informe de validación debe estar disponible previa solicitud. En el nuevo protocolo deberá mencionarse el proceso de validación con la oficina de examen de contacto. En algunos casos particulares, por ejemplo un "protocolo de secreto comercial" (esterilidad masculina citoplasmática en la col), el protocolo y el informe de validación no podrán compartirse fuera de las oficinas de examen.

V. PROTOCOLO ESTÁNDAR PARA EL PROTOCOLO DE MARCADORES MOLECULARES ESPECÍFICOS DE CARACTERÍSTICAS

33. Los elementos obligatorios se indican en la columna "información esencial", los demás elementos pueden utilizarse en función del protocolo de ensayo característico. Si un laboratorio desea adaptar/modificar/cambiar un capítulo obligatorio o un elemento de un capítulo obligatorio, debe validar su método en comparación con el método de referencia (para demostrar que se obtienen los mismos resultados que con el método publicado).

Cuadro 1: Protocolo estándar de marcadores moleculares específicos de características (véase el documento TWV/54/7 "Utilización de técnicas moleculares en el examen DHE". Las modificaciones están resaltadas en gris)

Capítulo	Elementos de un protocolo estándar de marcadores moleculares específicos de características	Ejemplo	Información esencial para la armonización	Observación
1	característica	Resistencia al virus del mosaico del tomate (ToMV) <i>Véase TG/44/11/rev3 - Ad 51: ii Prueba del marcador de ADN</i>	Sí	
2	Genes y alelos	<i>Véase TG/44/11/rev3 - Ad 51: ii Prueba de marcadores de ADN add 2</i>	Sí	Necesidad de evitar el marcador dominante o el marcador de presencia/ausencia, de lo contrario deberá evaluarse la solidez.
2.1	Gen(es) diana	Gen de resistencia Tm2 Arens, P. et al (2010)	Sí	a) archivo(s) que contiene(n) la información sobre la secuencia del ADN (orden de los nucleótidos) b) referencia a información sobre ADN en bases de datos públicas (como GeneBank) c) referencia a publicaciones (científicas) en las que se revele la información de la secuencia de ADN de los niveles de expresión del carácter. d) referencia a una posición concreta en la versión del genoma de referencia publicada.
2.2	Alelo correspondiente al estado 1	Tm2 y Tm2 ² Arens, P. et al (2010)	Sí	a) archivo(s) que contiene(n) la información sobre la secuencia del ADN (orden de los nucleótidos) b) referencia a información sobre ADN en bases de datos públicas (como GeneBank) c) referencia a publicaciones (científicas) en las que se revele la información de la secuencia de ADN de los niveles de expresión del carácter. d) referencia a una posición concreta en la versión publicada del genoma de referencia en combinación con el SNP o INDEL responsable del estado de expresión.
2.3	Alelo correspondiente al estado de expresión n	tm2 Arens, P. et al (2010)	Sí	a) archivo(s) que contiene(n) la información sobre la secuencia del ADN (orden de los nucleótidos) b) referencia a información sobre ADN en bases de datos públicas (como GeneBank) c) referencia a publicaciones (científicas) en las que se revele la información de la secuencia de ADN de los niveles de expresión del carácter. d) referencia a una posición concreta en la versión publicada del genoma de referencia en combinación con el SNP o INDEL responsable del estado de expresión.
3	Cebadores (y sondas)	<i>Véase TG/44/11/rev3 - Ad 51: ii Prueba de marcadores de ADN añadir 3, 3.1 y 3.2</i>	Sí	Secuencias de cebadores y sondas, referencia a accesiones y secuencias en bases de datos públicas (números Genebank), bibliografía
3.1	Cebadores (y sondas) para detectar el alelo "9"		Sí	Primer Secuencias correspondientes a alelo(s) para la expresión "9" (resistencia)
3.2	Cebadores (y sondas) para detectar el alelo "1"		Sí	Primer Secuencias correspondientes a alelo(s) para la expresión "1" (susceptibilidad)

Capítulo	Elementos de un protocolo estándar de marcadores moleculares específicos de características	Ejemplo	Información esencial para la armonización	Observación
3.3	Cebadores (y sondas) para detectar el alelo "x"		SÍ	Primer Secuencias correspondientes a los alelos de la expresión "x"
4	Formato de la prueba			
4.1	Número de plantas por genotipo	>=20	SÍ	se requiere un número mínimo de plantas individuales (véase 5.2.1a) el examen del marcador se realiza en el mismo número de plantas individuales, con los mismos criterios de distinción, homogeneidad y estabilidad que para el examen del carácter mediante un ensayo de observación (TGP 15)
4.2	Varietades de control	Véase TG/44/11/rev3 - Ad 51: ii Prueba de marcadores de ADN añadir 4.2	SÍ	Varietades de control (las mismas que en el ensayo de observación) como patrones que representan todas las combinaciones pertinentes de alelos. Por ejemplo, homocigoto para el alelo correspondiente al estado de expresión 9 (presente), homocigoto para el alelo correspondiente al estado de expresión 1 (susceptible) y heterocigoto (ambos alelos están presentes en un diploide) correspondiente al estado de expresión resistente, susceptible o intermedio (dependiendo de la función del gen; dominante - recesivo). Pueden utilizarse directamente controles de ADN.
4.3	Controles de procesos	por ejemplo, <i>el tampón utilizado para la extracción; un marcador dirigido al gen de la citocromo oxidasa como marcador interno de amplificación</i>	SÍ	<ul style="list-style-type: none"> a) Control(es) negativo(s) del proceso b) Control(es) positivo(s) de ADN que pueden ser las variedades de control c) Control interno de amplificación en caso de marcador de presencia/ausencia
5	Preparativos	Por ejemplo, muestreo de plántulas de 4 días seguido de extracción de ADN mediante el método CTAB.	NO	Depende del método utilizado. No figura en las directrices de ensayo. Pueden facilitarse protocolos detallados como ejemplo en el anexo o solicitarse al instituto que desarrolló el marcador.
6	Rendimiento o técnica del método	por ejemplo, PCR convencional, TETRA-ARMS, qPCR, KASP, secuenciación de amplicones Véase TG/44/11/rev3 - Ad 51: ii Prueba de marcadores de ADN añadir 6	SÍ	.
6.1	Condiciones particulares	por ejemplo, protocolo de PCR que describa las concentraciones de cebadores, enzimas y dNTP, y el esquema de los ciclos de PCR	NO	Depende del método utilizado. No figura en las directrices de ensayo. Pueden facilitarse protocolos detallados como ejemplo en el anexo o solicitarse al instituto que desarrolló el marcador.
6.2	Hardware o infraestructura particular	por ejemplo, máquinas, kits comerciales, fabricación de componentes, números de lote de productos químicos	NO	Depende del método utilizado. No figura en las directrices de ensayo. Pueden facilitarse protocolos detallados como ejemplo en el anexo o solicitarse al instituto que desarrolló el marcador.
7	Observaciones		NO	

Capítulo	Elementos de un protocolo estándar de marcadores moleculares específicos de características	Ejemplo	Información esencial para la armonización	Observación
		Por ejemplo, bandas en gel de agarosa (PCR convencional), valores Ct (qPCR) Llamada de variantes basada en lecturas de secuenciación.		Depende del método utilizado. No figura en las directrices de ensayo. Pueden facilitarse protocolos detallados como ejemplo en el anexo o solicitarse al instituto que desarrolló el marcador.
7.1	Validez de los resultados	Por ejemplo, para qPCR, compruebe si existen curvas de amplificación exponencial típicas. Compruebe si los controles son los esperados (controles negativos = sin señal; controles positivos = muestran las señales esperadas para todos los fluoróforos).	Sí	Según el método utilizado.
8	Interpretación de los resultados de las pruebas	Véase TG/44/11/rev3 - Ad 51: ii Prueba de marcadores de ADN añadir 8	Sí	Relación entre alelos y expresiones (con sus notas)
9	Validación del método,	Este protocolo se validó mediante un ensayo interlaboratorios con diferentes laboratorios (por ejemplo, Interlaboratory Comparative Test Report, INVITE 2024).	Sí	
9.1	Contacto con la oficina de examen	por ejemplo, Naktuinbouw	Sí	Contacto del instituto que ha desarrollado este protocolo, Nombre del servicio.

VI. ENCUESTA DE SEGUIMIENTO TRAS LA APROBACIÓN

34. La validación del marcador no es fija, ya que pueden surgir nuevas genéticas en el mercado. Se trata de un proceso de evaluación continua. La especificidad debe reevaluarse tras la aceptación de la validación utilizando pruebas dobles al menos durante el primer año con el método de observación.

35. Tras el primer año de aceptación del protocolo, deberán realizarse controles morfológicos de aproximadamente el 10% de las nuevas variedades.

[Fin del anexo y del documento]