S

BMT Guidelines (proj.14)
ORIGINAL: Inglés
FECHA: 15 de enero de 2009

UPOV

UNIÓN INTERNACIONAL PARA LA PROTECCIÓN DE LAS OBTENCIONES VEGETALES
GINEBRA

PROYECTO

DIRECTRICES PARA LOS PERFILES DE ADN: SELECCIÓN DE MARCADORES MOLECULARES Y CREACIÓN DE UNA BASE DE DATOS ("DIRECTRICES BMT")

preparadas por la Oficina de la Unión

para su examen por el Comité Técnico en su cuadragésima quinta sesión, que se celebrará en Ginebra del 30 de marzo al 1 de abril de 2009

Nota sobre la versión del proyecto

Con el ~~**tachado**~~ **(sombreado)** se indica lo que se propone* suprimir del texto presentado al Consejo en su cuadragésima primera sesión ordinaria, celebrada en Ginebra el 25 de octubre de 2007 (documento BMT Guidelines (proj.9)).

Con el **subrayado (sombreado)** se indica lo que se propone* introducir en el texto presentado al Consejo en su cuadragésima primera sesión ordinaria, celebrada en Ginebra el 25 de octubre de 2007 (documento BMT Guidelines (proj.9)).

Las **notas finales** se ofrecen a título de información básica para el examen del presente proyecto y no formarán parte de la versión definitiva del documento publicado.

*(*Propuesta del Grupo de Trabajo sobre Técnicas Bioquímicas y Moleculares, y Perfiles de ADN en particular (BMT), formulada en su undécima reunión, celebrada en Madrid (España) del 16 al 18 de septiembre de 2008, salvo indicación en contrario en la nota final.)*

ÍNDICE

A. INTRODUCCIÓN **3**

B. PRINCIPIOS GENERALES **3**

1. Selección de una metodología de marcadores moleculares 3
2. Selección de marcadores moleculares 4
   - *2.1 Criterios generales* *4*
   - *2.2 Criterios para tipos específicos de marcadores moleculares* *4*
3. Acceso a la tecnología 6
4. Material a analizar 6
   - *4.1 Fuente del material vegetal* *6*
   - *4.2 Tipo de material vegetal* *6*
   - *4.3 Tamaño de la muestra* *6*
   - *4.4 Muestra de referencia de ADN* *7*
5. Normalización de los protocolos analíticos 8
   - *5.1 Introducción* *8*
   - *5.2 Criterios de calidad* *8*
   - *5.3 Fase de evaluación* *8*
   - *5.4 Evaluación de los datos moleculares* *9*
6. Bases de datos 10
   - *6.1 Tipo de base de datos* *10*
   - *6.2 Modelo de base de datos* *10*
   - *6.3 Diccionario de datos* *10*
   - *6.4 Relación de los cuadros* *11*
   - *6.5 Transferencia de datos a la base de datos* *12*
   - *6.6 Acceso a los datos y titularidad* *12*
   - *6.7 Análisis de los datos* *12*
   - *6.8 Validación de la base de datos* *13*
7. Resumen 14

GLOSARIO **15**

Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR) 15
Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP) 15
Secuencias Polimórficas Amplificadas y Cortadas (CAPS) 15
Regiones Amplificadas Caracterizadas por Secuencia (~~**SCARS**~~**SCARs**) 16
~~Valores del Contenido de Información Polimórfica (PIC)~~ 16
Pig-tail 16
Alelo nulo 16
Bandas *Stutter* 16

A. INTRODUCCIÓN

El presente documento (Directrices BMT) tiene por finalidad ofrecer orientaciones para la elaboración de metodologías armonizadas destinadas a generar datos moleculares de gran calidad para diversas aplicaciones. Las Directrices BMT también tienen el propósito de abordar la creación de bases de datos de perfiles moleculares de variedades vegetales, obtenidos posiblemente en laboratorios diferentes y mediante el empleo de tecnologías también diferentes. ~~Ello demanda~~ Además, el objetivo del presente documento es lograr un alto grado de calidad de los marcadores y ~~exige que los datos obtenidos~~ estimular el deseo de obtener datos reproducibles con la ayuda de esos marcadores aun cuando se den situaciones en las que los equipos y los reactivos químicos sean diferentes. ~~Además es~~ Es preciso tomar precauciones específicas para asegurar la calidad de ~~la información que se introduce en~~ las entradas que se incluyen en la base de datos.

~~[a] Respecto a la posibilidad de usar marcadores moleculares en el examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad (DHE), en los documentos TC/38/14 CAJ/45/5 y TC/38/14 Add.CAJ/45/5 Add. se explica la situación actual en la UPOV.~~

B. PRINCIPIOS GENERALES

1. Selección de una metodología de marcadores moleculares

1.1 ~~Algunos de los~~ Los siguientes son criterios ~~más~~ importantes para seleccionar una metodología ~~los siguientes~~:

a) reproducibilidad de la producción de datos entre distintos laboratorios y plataformas de detección (tipos de equipo diferentes);
b) repetibilidad en el tiempo;
c) poder de discriminación;
d) posibilidades para la creación de bases de datos; y
e) accesibilidad de la metodología.

1.2 Dado el constante avance de la tecnología y la disponibilidad de equipos nuevos, para garantizar la viabilidad de las bases de datos es importante que la interpretación de los datos producidos sea independiente del equipo usado para su obtención. Esto es lo que sucede, por ejemplo, en el caso de los datos de secuenciación de ADN. Al principio, estos datos se obtenían empleando iniciadores marcados radiactivamente y geles de secuencia, mientras que ahora pueden obtenerse mediante el uso de colorantes fluorescentes seguido de una separación en sistemas de electroforesis capilar en gel de alto rendimiento y sumamente automatizados.

1.3 A pesar de estas diferencias, los datos obtenidos por medio de las distintas técnicas son coherentes entre sí e independientes de la técnica empleada para su obtención. Esto también puede aplicarse a los datos obtenidos mediante, por ejemplo, el uso de microsatélites (secuencias simples repetidas, SSR) de ADN o de polimorfismos de nucleótido único (SNP). Esta capacidad de repetibilidad y reproducibilidad es un factor importante en la creación, el funcionamiento y la perdurabilidad de las bases de datos, y es de gran importancia en la creación de una base de datos con un mantenimiento centralizado y con información verificada procedente de fuentes diversas. ~~Una base de datos, con un mantenimiento centralizado y con información verificada procedente de fuentes diversas, sólo puede crearse~~

~~de esta manera si se ha de atender al coste-eficacia, es decir, efectuando la considerable inversión exigida una única vez.~~

1.~~3~~4 ~~Los tipos de~~ Las técnicas moleculares que pueden utilizarse para definir los perfiles de las variedades están limitadas por el requisito de que los datos han de ser repetibles, reproducibles y coherentes. Así, si bien en el ámbito de la investigación se han utilizado con éxito diversas técnicas de perfiles de ADN multilocus, en muchas de ellas la codominancia no es fácil de registrar y la reproducibilidad de los patrones de bandas complejos entre laboratorios que usan equipos diferentes puede ser un problema.

1.5 ~~Se considera que estos~~ Estos factores plantean dificultades en el contexto de los perfiles de variedades. Por consiguiente, el presente documento se centra en las consideraciones y recomendaciones en torno a los usos de los SSR (microsatélites) que han sido bien definidos e investigados y, por cuanto respecta al futuro, en la información sobre secuenciación (es decir, los SNP o polimorfismos de nucleótido único). Otras técnicas basadas en la información sobre la secuencia del ADN, como las ~~CAPS (~~secuencias polimórficas amplificadas y cortadas (CAPS) y las ~~SCAR (~~regiones amplificadas caracterizadas por secuencia (SCAR) posiblemente también puedan satisfacer los criterios antes mencionados, pero su empleo en la definición de los perfiles de ADN de las variedades vegetales no se ha explorado todavía.

2. Selección de marcadores moleculares

2.1 Criterios generales

A continuación se indican los criterios generales para seleccionar un marcador o un conjunto de marcadores específicos; estos criterios son aplicables a todos los marcadores moleculares independientemente del uso al cual se destinen, si bien, como es sabido, determinados usos pueden imponer otros criterios adicionales:

a) nivel útil de polimorfismo ~~(indicado, por ejemplo, mediante un valor PIC (de contenido de información polimórfica: véase el Glosario) obtenido para un conjunto representativo de variedades~~;
b) repetibilidad y reproducibilidad en distintos laboratorios a efectos de evaluación de los datos;
c) distribución conocida de los marcadores a través del genoma (es decir, posición en el mapa) –aun no siendo indispensable, esta información es útil y ayuda a evitar la selección de marcadores que puedan estar ligados entre sí; y
d) evitar, en la medida de lo posible, marcadores con alelos “nulos” (alelo cuyo efecto es la ausencia de un producto PCR a nivel molecular) – nuevamente, no es esencial pero sí aconsejable.

2.2 Criterios para tipos específicos de marcadores moleculares

2.2.1 Marcadores microsatélite ~~(SSR)~~

2.2.1.1 El análisis de secuencias simples repetidas (SSR o microsatélites: véase el Glosario) utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está actualmente muy extendido y ofrece varias ventajas.

2.2.1.2 Los marcadores SSR se expresan de modo codominante y por lo general son fáciles de evaluar (registrar) y pueden mapearse sin dificultad. Dichos marcadores han sido empleados y analizados ~~Su capacidad de análisis ha sido demostrada~~ en distintos laboratorios, y en ~~(si se presta suficiente atención a las~~ condiciones experimentales~~)~~ específicas pueden ser ~~son~~ sólidos y ~~pueden repetirse~~ repetibles. Además, pueden analizarse por medio de secuenciadores automáticos de ADN no radiactivos de alto rendimiento, basados ya sea en electroforesis en gel o en electroforesis capilar, siendo posible analizar varios de ellos al mismo tiempo (multiplexión).

2.2.1.3 La selección de marcadores de gran calidad es esencial para un análisis eficaz con microsatélites. Ello exige tomar en consideración, entre otros:

a) El grado de *stutter* (la producción de una serie de una o más bandas cuyo tamaño difiere en 1 unidad de repetición).
b) (n+1) picos; la Taq polimerasa suele agregar 1 pb al extremo de un fragmento. Esto puede evitarse mediante la utilización de iniciadores "con *pigtail*" (véase el Glosario).
c) El tamaño del producto amplificado.
d) La separación efectiva entre los diversos alelos en ~~diferentes~~ sistemas de detección óptima.
e) La evaluación fiable y reproducible de los alelos en diferentes sistemas de detección.
f) El nivel de polimorfismo ~~(número de alelos detectados)~~ entre las variedades (obsérvese que ello requiere el análisis de una cantidad significativa de variedades).
g) Evitar posibles ligamientos.

2.2.1.4 Para poder evaluar los SSR en laboratorios distintos y por medio de equipos de detección diferentes, es de vital importancia que los alelos de referencia (es decir, conjuntos de variedades) se definan y se incluyan en todos los análisis. Estos alelos de referencia son necesarios porque los marcadores de peso molecular se comportan de modo diferente entre los distintos sistemas de detección generalmente disponibles y, por tanto, no son indicados para la identificación de los alelos.

2.2.1.5 Los iniciadores utilizados en cada laboratorio deben ser sintetizados por un proveedor garantizado, para reducir la posibilidad de obtener perfiles de ADN diferentes debido a la utilización de iniciadores sintetizados por distintas fuentes.

2.2.2 Polimorfismos de nucleótido único (SNP)

Los polimorfismos de nucleótido único (SNP: véase el Glosario) pueden detectarse por secuenciación del ADN, una técnica habitual que por lo general muestra elevados niveles de repetibilidad en el tiempo y reproducibilidad entre laboratorios. Sin embargo, ~~en la actualidad~~ la detección de los SNP específicos puede efectuarse~~se efectúa~~ por diversas técnicas, muchas de las cuales no son todavía rutinarias. Por su propia naturaleza, en las plantas diploides, los SNP sólo tienen dos estados alélicos, si bien en las poliploides esto puede variar por efecto de la dosificación. La estructura simple de los SNP ~~Esto~~ hace que ~~la~~ su evaluación ~~de los SNP~~ sea relativamente sencilla y fiable~~, y atenúa o elimina muchos de los problemas mencionados anteriormente~~. También significa que, para definir el perfil de un genotipo determinado de forma eficaz y eficiente, será preciso analizar una gran cantidad de marcadores, ya sea individualmente o por multiplexión.

3. Acceso a la tecnología

Algunos marcadores moleculares y materiales están a libre disposición del público. Pero debido a la gran inversión que probablemente deberá hacerse para obtener, por ejemplo, marcadores SSR de gran calidad, los marcadores y otros métodos y materiales pueden estar amparados por derechos de propiedad intelectual. La UPOV ha elaborado directrices para la utilización de los productos y las metodologías que son objeto de derechos de propiedad intelectual ~~(véase el documento TGP/7/1 Anexo 3, GN 14); a efectos del presente documento han de seguirse dichas orientaciones~~ a efectos del presente documento han de seguirse dichas orientaciones.[b] Es recomendable abordar todos los aspectos concernientes a los derechos de propiedad intelectual al principio de cualquier trabajo de desarrollo.

4. Material a analizar

Las cuestiones principales en relación con el material a analizar son la fuente del material, el tipo de material y cuántas muestras se precisa analizar.

4.1 Fuente del material vegetal

El material vegetal a analizar deberá ser una muestra auténtica y representativa de la variedad y, a ser posible, habrá sido obtenida a partir de la muestra de la variedad examinada a los efectos de los Derechos de Obtentor o del registro oficial. Para usar muestras de material presentado para el examen a efectos de los Derechos de Obtentor o del registro oficial se requiere el permiso de la autoridad pertinente, bien sea el obtentor o el conservador, según corresponda. ~~Las plantas individuales de las cuales se tomaron las muestras deberían, cuando corresponda, ser rastreables por si posteriormente se demostrara que algunas de ellas no eran representativas de la variedad~~. El material vegetal del que se tomaron las muestras debería ser rastreable por si posteriormente se demostrara que algunas de ellas no eran representativas de la variedad.

4.2 Tipo de material vegetal

El tipo de material vegetal a muestrear para la extracción del ADN y el procedimiento empleado para el muestreo dependerán en gran medida del cultivo o la especie vegetal de que se trate. Por ejemplo, en el caso de las variedades de propagación por semilla pueden utilizarse éstas como fuente del ADN, mientras que en el caso de las variedades de multiplicación vegetativa el ADN puede extraerse del material foliar. Sea cual fuere la fuente del material, el método empleado para el muestreo y la extracción del ADN debe estar normalizado y documentado. Además, es menester verificar mediante análisis de ADN la coherencia de los resultados obtenidos por los métodos de muestreo y extracción.

4.3 Tamaño de la muestra

Es indispensable que las muestras tomadas para el análisis sean representativas de la variedad. A ese respecto, deberán tomarse en consideración las particularidades de su reproducción sexuada o su multiplicación vegetativa (véase la Introducción General). El tamaño de la muestra deberá fijarse teniendo en cuenta los procedimientos estadísticos adecuados.

4.3.1 Variedades de multiplicación vegetativa

En principio, para las variedades de multiplicación vegetativa basta con analizar una sola muestra, porque todos los individuos deberían ser idénticos. No obstante y en cualquier caso es recomendable analizar siempre al menos muestras duplicadas. En caso de encontrar diferencias se habrán de analizar muestras complementarias.

4.3.2 Variedades autógamas y principalmente autógamas o líneas endocriadas

No siempre es conveniente dar por sentado que las variedades autógamas y principalmente autógamas o las líneas endocriadas son homocigóticas en todos los loci, incluso en los loci SSR o SNP. La heterocigosidad residual, la polinización cruzada o la mezcla física pueden dar lugar a heterogeneidad. Por este motivo, generalmente se recomienda analizar un número de semillas individuales o muestras de un número de plantas, puesto que ello revelará para poner al descubierto cualquier posible heterocigosidad de este tipo. Sin embargo, puede haber razones (entre ellas, el costo) que justifiquen el análisis de un muestreo en bloque de un número acordado de individuos para representar el perfil de ADN de una variedad.

4.3.3 Variedades alógamas

El mismo tipo de consideraciones es aplicable en principio a las variedades de especies alógamas. Por lo general se recomienda analizar semillas o plantas individuales, ya que las diferencias entre variedades pueden ser el resultado de diferencias en las frecuencias alélicas (o de banda), así como de la presencia o la ausencia de alelos o bandas particulares. De cualquier modo, puede haber razones (entre ellas, el costo) que justifiquen el análisis de un muestreo en bloque de un número acordado de individuos para representar el perfil de ADN de una variedad.

4.3.4 Híbridos

El método adecuado para asegurar que las muestras tomadas para el análisis de los híbridos sean representativas de la variedad dependerá del tipo de híbrido. Se deberá tener en cuenta que las variedades híbridas son heterocigotas en los loci codificadores de los marcadores de ADN pero aun así siguen siendo fenotípicamente uniformes. El número de muestras elegidas para el análisis dependerá de la cuestión exacta que se esté abordando y del tipo de variedad híbrida a valorar. A estos efectos habrá de tenerse en cuenta la información concerniente a los distintos tipos de variedades híbridas proporcionada en el documento 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" (véase el Capítulo 6.4.3).

4.4 Muestra de referencia de ADN

Es aconsejable crear una colección de muestras de referencia de ADN con el material vegetal muestreado conforme a las secciones 4.1, 4.2 y 4.3. Poder almacenar las muestras de referencia de ADN y suministrarlas a otros laboratorios terceros representa una ventaja. Las muestras de ADN deberían almacenarse de forma tal que se evite su degradación.

5. Normalización de los protocolos analíticos

5.1 Introducción

El presente documento no pretende suministrar protocolos técnicos pormenorizados para la producción de perfiles de ADN de variedades. En principio se puede utilizar cualquier metodología analítica apropiada, pero es importante validar la metodología por el conducto adecuado. La validación puede realizarse a través de algún método reconocido a nivel internacional o bien elaborando un enfoque orientado al rendimiento. Cualquiera sea el caso, el presente documento ofrece algunas consideraciones útiles de carácter general.

El método a utilizar para la composición de genotipos y la creación de bases de datos ha de ser técnicamente sencillo de aplicar, fiable y sólido, y ha de permitir la evaluación fácil e irrefutable de los perfiles de los marcadores en laboratorios diferentes. Ello requiere un cierto grado de normalización, por ejemplo, en relación con la selección de los marcadores, los alelos de referencia, y la valoración de alelos (alelos *calling/scoring*).

5.2 Criterios de calidad

5.2.1 Es importante ~~acordar ciertos~~ considerar criterios de calidad en relación, por ejemplo, con:

a) la calidad del ADN;
b) los métodos de extracción de ADN;
~~b~~c) las secuencias de iniciadores utilizadas;
~~c~~d) la polimerasa a emplear en las metodologías basadas en PCR;
~~d~~e) para las metodologías basadas en PCR, la cantidad o concentración de cada componente PCR y de los demás componentes; y
~~e~~f) las condiciones del ciclo de PCR.

5.2.2 La metodología debe enunciarse de forma detallada en un protocolo.

5.3 Fase de evaluación

5.3.1 Introducción

Para seleccionar marcadores adecuados y producir protocolos de laboratorio aceptables para una especie dada, es aconsejable una fase de evaluación preliminar en la que participe más de un laboratorio (es decir, un método de validación reconocido internacionalmente; por ejemplo, un *ring test* de conformidad con las normas acordadas a nivel internacional). Esta fase tendrá como principal objetivo seleccionar un conjunto de marcadores y normalmente incluirá la evaluación de los marcadores existentes, ya sea publicados o bien disponibles por otros medios. El número de marcadores a evaluar es variable y dependerá de las posibilidades que ofrezcan las distintas especies. Los marcadores deben proceder de fuentes fiables (por ejemplo, de publicaciones revisadas por homólogos) y obtenerse a través de proveedores garantizados. La decisión final acerca del número a evaluar será una ponderación entre los costos y la necesidad de producir al final del proceso un conjunto satisfactorio de marcadores acordados. El objetivo es producir un conjunto satisfactorio de marcadores que pueda ser analizado con seguridad y que pueda ser analizado, evaluado y registrado de forma reproducible en laboratorios diferentes, utilizando potencialmente distintos tipos de equipos y distintas fuentes de reactivos químicos, etc.

5.3.2 Elección de variedades

Como base de la fase de evaluación se elegirá un número conveniente de variedades, en función de la variabilidad genética dentro de la especie y el tipo de variedad en cuestión. La selección de variedades debería reflejar un nivel apropiado de diversidad y, si fuera posible, deberían incluir algunas variedades estrechamente relacionadas y algunas variedades morfológicamente similares, para que sea factible evaluar el grado de discriminación en tales casos.

5.3.3 Interpretación de los resultados

En la siguiente etapa de evaluación se incluirá, a ser posible, un método de validación reconocido internacionalmente para valorar la metodología de forma global y objetiva. Cualquier marcador que en esta fase de evaluación ocasione dificultades en cualquiera de los laboratorios participantes deberá ser rechazado para su uso ulterior. Si tenemos en cuenta que~~, según la experiencia,~~ la mayoría de los errores en los análisis de grandes colecciones de variedades proceden de errores de valoración, ~~lo ideal sería crear~~ las bases de datos deberían ser creadas a partir de muestras duplicadas (p. ej., distintas submuestras de semilla de la misma variedad), analizadas en ~~laboratorios diferentes~~ más de un laboratorio. El hecho de poder intercambiar las submuestras (o el ADN extraído de ellas) en la eventualidad de que se produzca alguna discrepancia, hace que este planteamiento sea muy eficaz para poner de relieve los errores de muestreo o aquellos debidos a la heterogeneidad dentro de las propias muestras, y para eliminar los posibles artefactos de laboratorio ~~(errores de sistema)~~.

5.4 Evaluación de los datos moleculares

Paralelamente a la fase de evaluación habrá de prepararse un protocolo de evaluación de alelos/bandas. Dicho protocolo deberá contemplar el modo de evaluar los elementos siguientes:

a) Alelos raros (alelos en un locus determinado que aparecen con una frecuencia que está por debajo de un umbral acordado (comúnmente, entre el 5 y el 10%) para una población);
b) Alelos nulos (alelos cuyo efecto es la ausencia de un producto PCR a nivel molecular);
c) Bandas “tenues” (bandas con intensidad inferior a un umbral de detección acordado, establecido ya sea empírica o automáticamente, y cuya valoración puede ser cuestionada);
d) Datos ausentes (cualquier locus para el cual por cualquier razón no hay datos registrados en una o más variedades);
e) Bandas monomórficas (alelos/bandas que aparecen en todas las variedades analizadas, es decir, que no son polimórficas en una determinada colección de variedades).

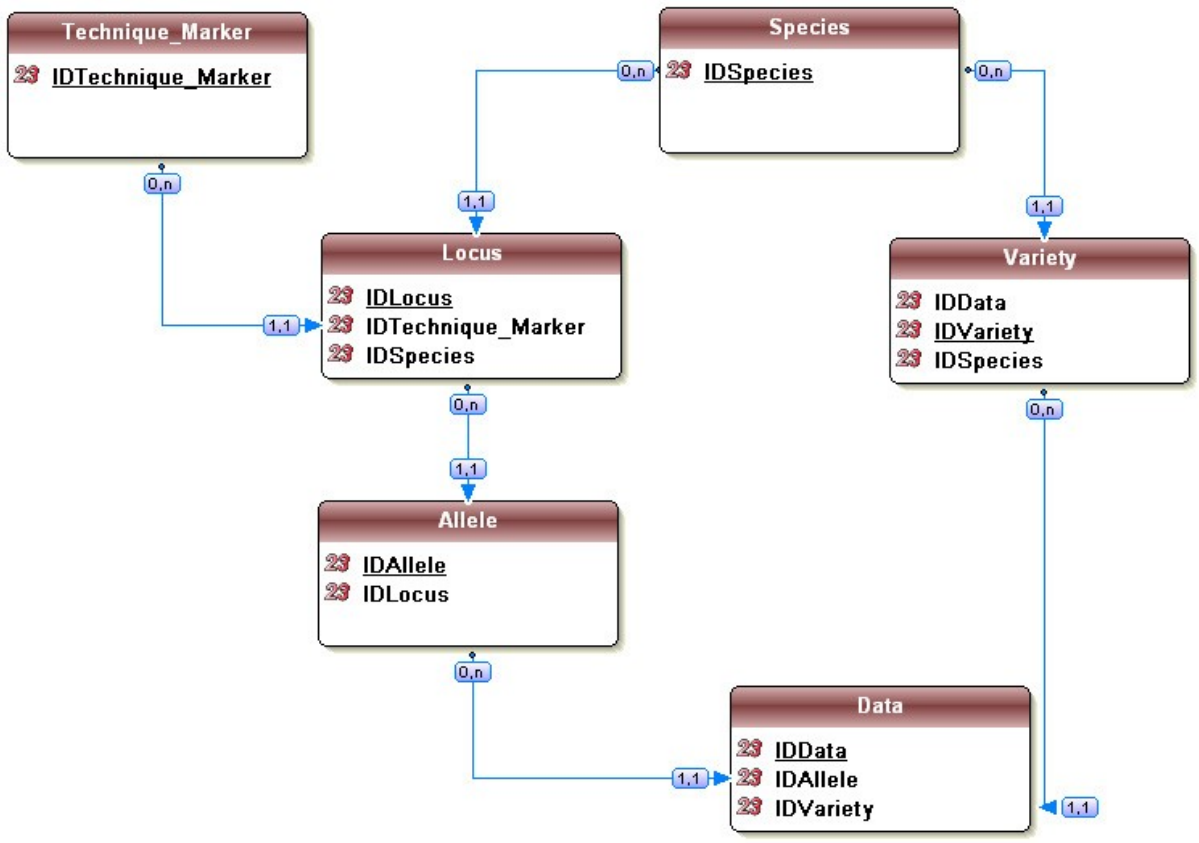
6. Bases de datos

6.1 Tipo de base de datos

Los datos moleculares pueden almacenarse de muchas maneras diferentes y, en consecuencia, es importante que la estructura desarrollada para la base de datos sea compatible con todos los usos a los que pretendidamente se destinarán los datos.

6.2 Modelo de base de datos

La definición del modelo de base de datos estará a cargo de expertos en bases de datos de T.I., quienes contarán para ello con la colaboración de los usuarios de la base de datos. El modelo de base de datos habrá de contener, como mínimo, seis objetos básicos: Species (especie); Variety (variedad); Technique (técnica); Marker (marcador); Locus (locus); y Allele (alelo).



6.3 Diccionario de datos

6.3.1 En una base de datos, cada uno de los objetos configura un cuadro en el que se definen los campos. Por ejemplo:

a) Técnica/Código marcador:

designa el código o el nombre de la técnica o el tipo de marcador utilizado, por ejemplo, *SSR*, *SNP*, *etc.*

b) Código locus:

Designa el nombre o el código del locus para la especie de que se trate, por ejemplo, *gwm 149, A2, etc.*

c) Código alelo:

designa el nombre o el código del alelo de un locus determinado locus de la especie de que se trate, por ejemplo, *1, 123, etc.*

d) Valor de los datos:

designa el valor de los datos de una muestra determinada respecto de un alelo presente en un locus determinado, por ejemplo, *0 (ausencia), 1 (presencia), 0.25 (frecuencia) etc.*

e) Variedad:

el objeto para el que se han obtenido los datos.

f) Especie:

la especie se designa mediante el nombre botánico o el nombre nacional común que, a veces, se refiere también al tipo de variedad (por ejemplo, variedades del tipo de verano o de primavera, etc.). La utilización del código de la UPOV evitaría los problemas que plantean los sinónimos, por lo que resultaría ventajoso en términos de coordinación.

6.3.2 En el "diccionario de datos" debe especificarse, en cada cuadro, el número de campos, su nombre y definición, y los posibles valores y normas que han de aplicarse.

6.4 Relación de los cuadros

6.4.1 La relación entre los cuadros es un aspecto importante en el diseño de la base de datos. A continuación se presenta la relación que se establece entre ellos:

Cuadro	*Relación*	Cuadro	Descripción
Mujer	*0* o *1 a n* *(0, n)*	Hijo	*0*: es posible que una mujer no tenga hijos *1 a n*: es posible que una mujer tenga de 1 a n hijos (en cuyo caso es madre)
Hijo	*1 a 1* *(1,1)*	Mujer	Un hijo determinado sólo tiene una madre biológica

6.4.2 En el siguiente cuadro figura la relación entre los seis objetos básicos que debe contener como mínimo la base de datos, como se propone en el modelo de base de datos de la Sección 6.2:

Cuadro	*Relación*	Cuadro	Descripción
Técnica/marcador	*0* o *1 a n*	Locus	*0*: Una técnica/un marcador puede figurar en Técnica/marcador,

			aunque en la base de datos todavía no se esté utilizando ningún locus/alelo *1 a n*: un tipo de marcador determinado puede proporcionar de 1 a n loci útiles
Locus	*1 a 1*	Técnica/marcador	Un locus determinado se define dentro del ámbito de una técnica/un marcador determinados
Locus	*1 a n*	Alelo	Por cada locus, puede describirse 1 o más de 1 alelo
Alelo	*1 a 1*	Locus	Un alelo determinado se define dentro del ámbito de un Locus determinado
Alelo	*0* o *1 a n*	Datos	*0*: puede definirse un alelo determinado, pero sin datos *1 a n*: un alelo determinado puede estar presente en 1 a n datos
Datos	*1 a 1*	Alelo	los datos corresponden a un alelo determinado
Variedad	*0* o *1 a n*	Datos	*0*: no hay datos para la variedad *1 a n*: hay datos para la variedad
Datos	*1 a 1*	Variedad	los datos corresponden a una variedad determinada
Datos	*1 a 1*	Especie	los datos se obtienen para una variedad determinada y, luego, para la especie de la variedad
Especie	*0* o *1 a n*	Datos	*0*: es posible que no haya datos para una especie. *1 a n*: es posible que haya de 1 a n datos para una especie.

6.5 Transferencia de datos a la base de datos

Al transferir y transcribir los datos es posible introducir errores; para reducir esta posibilidad, es aconsejable automatizar en la mayor medida posible la transferencia de los datos a la base de datos.

6.6 Acceso a los datos y titularidad

Se recomienda abordar todas las cuestiones concernientes a la titularidad de los datos y el acceso a los datos de la base de datos en el momento de iniciar cualquier trabajo.

6.7 Análisis de los datos

El método de análisis vendrá determinado por la finalidad a la que hayan de destinarse los datos; por tanto, las presentes directrices no incluyen ninguna recomendación específica al respecto.

6.8 Validación de la base de datos

Al concluir la primera fase de la base de datos es recomendable llevar a cabo una “prueba a ciegas”, es decir, distribuir un número de muestras a distintos laboratorios y solicitarles que las identifiquen utilizando el protocolo acordado y la base de datos.

7. Resumen

A continuación se ofrece un resumen del enfoque recomendado para la selección y utilización de marcadores moleculares para la creación de bases de datos centralizadas y sostenibles de perfiles de ADN de variedades (es decir, bases de datos que en el futuro puedan llenarse con datos procedentes de una diversidad de fuentes, independientemente de la tecnología empleada).

a) considerar el enfoque cultivo a cultivo;
b) acordar un tipo de marcador aceptable y la fuente del mismo;
c) acordar las plataformas y los equipos de detección aceptables;
d) acordar los laboratorios que participarán en la prueba;
e) acordar las cuestiones relativas a la calidad (véase la sección 5.2);
f) verificar la fuente del material vegetal empleado (véase la sección 4);
g) acordar los marcadores a utilizar en una fase de evaluación preliminar en la que se contará con la colaboración de más de un laboratorio y se usarán equipos de detección diferentes (véase la sección 2);
h) realizar una evaluación (véase la sección 5.3);
i) elaborar un protocolo para la evaluación de los datos moleculares (véase la sección 5.4);
j) acordar el material vegetal y el conjunto de referencias a analizar, y la fuente de los mismos;
k) analizar la colección de variedades acordada – en distintos laboratorios y con distintos equipos de detección, utilizando muestras duplicadas y, si surgiesen problemas, intercambiando muestras o extractos de ADN;
l) usar en todos los análisis variedades, muestras de ADN y alelos de referencia;
m) verificar todas las etapas (inclusive la entrada de datos) – lograr la mayor automatización posible;
n) efectuar una “prueba a ciegas” de la base de datos en laboratorios diferentes;
o) adoptar los procedimientos para la adición de nuevos datos.

GLOSARIO

Microsatélites o Secuencias Simples Repetidas (SSR)

Los microsatélites, o secuencias simples repetidas (SSR), son secuencias de ADN que se repiten en pares, por lo general con una unidad de repetición de 2 a 4 pares de bases (por ejemplo, GA, CTT y GATA). En muchas especies, se ha demostrado la existencia de múltiples alelos para algunos microsatélites, debido a las variaciones en el número de copias de esta unidad de repetición. Los microsatélites pueden analizarse por la técnica de la PCR utilizando iniciadores específicos, procedimiento conocido como aproximación por microsatélites de sitio de secuencia marcada (STMS). Los alelos (productos de la PCR) pueden separarse por electroforesis en gel de agarosa o en gel de poliacrilamida. Para desarrollar microsatélites de sitio de secuencia marcada se necesita información sobre la secuencia de ADN que flanquea al microsatélite. Si bien esta información puede obtenerse en ocasiones a partir de las bases de datos de secuencias de ADN existentes, otras veces ha de conseguirse de forma empírica.

Polimorfismos de Nucleótido Único (SNP)

Los polimorfismos de nucleótido único (SNP) son variaciones que se producen en la secuencia de ADN cuando se altera un nucleótido único (A,T,C o G) de la secuencia del genoma. Por ejemplo, un SNP podría cambiar una secuencia de ADN de AAGGCTAA a ATGGCTAA. Por lo general, para que una variación pueda considerarse un SNP debe ocurrir al menos en el 1% de la población. El número potencial de marcadores SNP es muy elevado, lo cual significa que sería factible encontrarlos en cualquier parte del genoma. Los SNP pueden producirse tanto en las zonas codificadoras (genes) del genoma como en las zonas no codificadoras. El descubrimiento de los SNP trajo aparejada la secuenciación comparativa de varios individuos de una población. La identificación de los SNP potenciales se realiza comúnmente mediante la comparación de secuencias alineadas tomadas de las bases de datos de secuencias disponibles. Aunque los SNP pueden detectarse con relativa facilidad mediante PCR + electroforesis en gel, se están desarrollando procedimientos de análisis a gran escala y micromatrices que permitirán la evaluación automática de centenares de loci de SNP de una sola vez.

Secuencias Polimórficas Amplificadas y Cortadas (CAPS)

Las secuencias polimórficas amplificadas y cortadas (CAPS) son fragmentos de ADN que primero se amplifican mediante PCR utilizando iniciadores específicos de entre 20 y 25 pb y a continuación se digieren con una endonucleasa de restricción. Posteriormente, la electroforesis en gel de los productos digeridos permite identificar los polimorfismos de longitud producidos por la variación en la aparición de los sitios de restricción. En comparación con otros marcadores, como los RFLP, los polimorfismos son más difíciles de identificar debido al reducido tamaño de los fragmentos amplificados (300-1800 pb). Empero, el análisis CAPS no requiere hibridación Southern y detección radioactiva. Hasta la fecha, en general las CAPS se han venido aplicando principalmente en los estudios de cartografía génica.

Regiones Amplificadas Caracterizadas por Secuencia (~~SCARS~~SCARs)

Las regiones amplificadas caracterizadas por secuencia (~~SCARS~~SCARs) son fragmentos de ADN amplificados mediante PCR utilizando iniciadores específicos de entre 15 y 30 pb, diseñados a partir de secuencias polimórficas identificadas con anterioridad. La utilización de iniciadores PCR más largos permite a las SCAR eludir el problema de las bajas posibilidades de reproducibilidad. También suelen ser marcadores codominantes. Las SCAR son específicas de cada locus y se han venido aplicando en los estudios de cartografía génica y en la selección asistida por marcador.

~~**Valores del Contenido de Información Polimórfica (PIC)**~~

~~El valor del contenido de información polimórfica (PIC) es una medida de la diversidad alélica de un locus y se utiliza para estimar y comparar el poder de discriminación de los marcadores moleculares. El valor PIC de un marcador basado en la PCR se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:~~

$$1 - \sum_{j=1}^{n} P_{ij}^2$$

~~donde P_{ij} es la frecuencia del modelo PCR *j* para el genotipo *i*.~~

Pig-tail

En el análisis SSR, se denomina *pig-tail* la adición de una secuencia de oligonucleótidos a los iniciadores empleados en la PCR, con el objetivo de mejorar la claridad de los productos de la amplificación y reducir los artefactos.

Alelo nulo

En el análisis SSR, un "alelo nulo" es un alelo en un locus determinado cuyo efecto se aprecia como la ausencia de algún producto de la PCR.

Bandas *Stutter*

En el análisis SSR, las "bandas *stutter*" hacen referencia a una serie de una o más bandas que aparecen tras la PCR y cuyo tamaño difiere en 1 unidad de repetición.

---

[a] En la septuagésima cuarta sesión del Comité Consultivo, celebrada en Ginebra el 24 de octubre de 2007, la Delegación de los Estados Unidos de América se preguntó qué situación tendrían los documentos TC/38/14-CAJ/45/5 y TC/38/14 Add.-CAJ/45/5 Add. una vez aprobadas las Directrices BMT. En particular, subrayó que dichas directrices serían aprobadas por el Consejo mientras que los documentos TC/38/14-CAJ/45/5 y TC/38/14 Add.-CAJ/45/5 Add. no habían sido aprobados por el Consejo. El Comité Consultivo recomendó que se considere la situación de los documentos TC/38/14-CAJ/45/5 y TC/38/14 Add.-CAJ/45/5 Add., habida cuenta de que son objeto de referencia en la introducción del documento Directrices BMT (proj.9).

El Grupo de Trabajo sobre Técnicas Bioquímicas y Moleculares, y Perfiles de ADN en particular (BMT) convino en suprimir el segundo párrafo de la Sección A. "Introducción".

El Comité de Redacción Ampliado (TC-EDC) acordó que una solución sería suprimir el segundo párrafo de la Sección A. "Introducción", habida cuenta de que se preveía revisar los documentos TC/38/14-CAJ/45/5 y TC/38/14 Add.-CAJ/45/5 Add. El TC-EDC también tomó nota de la propuesta formulada en la reunión, de que los documentos TC/38/14-CAJ/45/5 y TC/38/14 Add.-CAJ/45/5 Add. podrían considerarse aprobados por el Consejo a la luz de que éste "tomó nota de la labor realizada por el Comité Técnico, los Grupos de Trabajo

Técnicos y el Grupo de Trabajo sobre Técnicas Bioquímicas y Moleculares y Perfiles de ADN en Particular, que figura en el documento C/36/10 ["Informe sobre la marcha de los trabajos del Comité Técnico, de los Grupos de Trabajo Técnico y del Grupo de Trabajo Sobre Técnicas Bioquímicas y Moleculares, y Perfiles de ADN en particular"]" (véase el documento C/36/13 "Informe", párrafo 21). El TC-EDC acordó que correspondía al Comité Consultivo examinar esta propuesta.

[b] El BMT propuso que el Consejo examine el texto incluido en el documento TGP/7/1, GN 14 en paralelo con las Directrices del BMT, y suprima esta frase si ese texto no resulta aceptable.

Extracto del documento TGP/7/1

"GN 14 (Plantilla de los documentos TG: Capítulo 7) – Caracteres examinados mediante métodos patentados

"a) En el caso de un carácter que pueda examinarse mediante un método patentado, el experto principal deberá divulgar toda información conocida sobre la patente o sobre solicitudes pendientes de patente que pudieran relacionarse con la evaluación de la expresión del carácter en cuestión. En la información sobre patentes conocidas deberán incluirse el nombre y los datos del titular de la patente, el número de registro y los países en los que haya sido concedida la patente (o las solicitudes pendientes, de ser el caso).

b) El experto principal deberá evaluar la importancia del método patentado en cuanto a la evaluación de la expresión de un carácter y la conveniencia de métodos alternativos, no patentados, si están disponibles. El experto principal y el Grupo de Trabajo Técnico pertinente deberán entonces decidir si sería mejor reexaminar la cuestión en una etapa ulterior o ponerse en contacto con el titular de la patente a fin de lograr un acuerdo para utilizar el método patentado. El Grupo de Trabajo Técnico podrá solicitar el asesoramiento del Comité Técnico y, si corresponde, éste podrá a su vez solicitar el asesoramiento del Comité Administrativo y Jurídico.

c) Si se decide ponerse en contacto con el titular de la patente, pueden plantearse tres situaciones:

i) que el titular de la patente renuncie a sus derechos sobre ese uso del método patentado relativo a la evaluación de la expresión de un carácter para el examen DHE y la elaboración de descripciones de variedades;

ii) que el titular de la patente esté dispuesto a negociar licencias con terceros, sin medidas discriminatorias y en condiciones razonables;

iii) que el titular de la patente no esté dispuesto a cooperar para lograr las soluciones expuestas en los puntos i) y ii).

d) En el caso c)i), una nota de pie de página en el carácter o los caracteres correspondientes de las directrices de examen deberá indicar que el método de evaluación de la expresión de este carácter está protegido por una patente, pero que el titular de la patente ha renunciado a sus derechos a los efectos del examen DHE y de la elaboración de descripciones de variedades. Los miembros del Grupo de Trabajo Técnico podrán decidir, teniendo en cuenta la importancia del carácter, si corresponde seleccionarlo como carácter señalado con asterisco.

e) En cuanto al caso c)ii), se recomienda que el carácter o los caracteres en cuestión no se seleccionen como caracteres señalados con asterisco, pues no satisfarán el requisito de accesibilidad que permite la armonización de la descripción de variedades utilizando caracteres señalados con asterisco. Los miembros del Grupo de Trabajo Técnico podrán decidir si las partes interesadas querrán mantener el carácter relacionado con el método protegido por patente como carácter estándar de las directrices de examen. Las partes interesadas podrán comenzar negociaciones con el titular de la patente para obtener licencias sin medidas discriminatorias y en condiciones razonables. Esas negociaciones quedarán al arbitrio de las partes interesadas y se celebrarán al margen de la UPOV. Deberá incluirse una nota que indique que el método de evaluación de la expresión del carácter está protegido por patente y que el titular de esa patente concederá licencias sin medidas discriminatorias y en condiciones razonables.

f) En cuanto al caso c)iii), se recomienda que el carácter o los caracteres relacionados con el método protegido por patente no se seleccionen como caracteres señalados con asterisco. Los expertos del Grupo de Trabajo Técnico pertinente podrán decidir, a la luz de la información disponible, por ejemplo, la experiencia de un Miembro de la Unión que haya utilizado el carácter para elaborar una descripción de variedad, si el carácter debería o no seleccionarse como carácter estándar de las directrices de examen. Deberá incluirse una nota indicando que el método de evaluación de la expresión del carácter está protegido por patente."

[Fin del documento]