

UNIÓN INTERNACIONAL PARA LA PROTECCIÓN DE LAS OBTENCIONES VEGETALES

Ginebra

COMITÉ TÉCNICO

**Quincuagésima sesión
Ginebra, 7 a 9 de abril de 2014**

REVISIÓN DEL DOCUMENTO TGP/7: FUENTE DEL MATERIAL DE REPRODUCCIÓN O
MULTIPLICACIÓN

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*

1. En el presente documento se expone una propuesta de orientación acerca de la fuente del material de reproducción o multiplicación, con objeto de incluirla en una futura revisión del documento TGP/7.

2. En el presente documento se utilizan las abreviaturas siguientes:

TC:	Comité Técnico
TC-EDC:	Comité de Redacción Ampliado
TWA:	Grupo de Trabajo Técnico sobre Plantas Agrícolas
TWC:	Grupo de Trabajo Técnico sobre Automatización y Programas Informáticos
TWF:	Grupo de Trabajo Técnico sobre Plantas Frutales
TWO:	Grupo de Trabajo Técnico sobre Plantas Ornamentales y Árboles Forestales
TWP:	Grupos de Trabajo Técnico
TWV:	Grupo de Trabajo Técnico sobre Hortalizas

3. El presente documento se estructura del modo siguiente:

ANTECEDENTES	2
EXAMEN POR LOS GRUPOS DE TRABAJO TÉCNICO EN 2013	2
PROPUESTA	3
ANEXO I: FUENTE DEL MATERIAL DE REPRODUCCIÓN O MULTIPLICACIÓN (PROPUESTA PRESENTADA A LOS GRUPOS DE TRABAJO TÉCNICO EN 2013)	
ANEXO II: FUENTE DEL MATERIAL DE REPRODUCCIÓN O MULTIPLICACIÓN (NUEVA PROPUESTA)	

ANTECEDENTES

4. En su cuadragésima novena sesión, celebrada en Ginebra del 18 al 20 de marzo de 2013, el Comité Técnico (TC) señaló que expertos de la Unión Europea presentarán al Grupo de Trabajo Técnico sobre Plantas Frutales (TWF) y al Grupo de Trabajo Técnico sobre Plantas Ornamentales y Árboles Forestales (TWO), en sus sesiones de 2013, información sobre la influencia del método de multiplicación vegetativa y el origen del material de reproducción, tomado de la planta, en el desarrollo futuro de la planta y en la expresión de los caracteres, así como sobre el modo en que podría abordarse esta cuestión en las directrices de examen (véase el párrafo 81 del documento TC/49/41 "Informe sobre las conclusiones").

5. En respuesta a la solicitud del TC, el redactor de la Unión Europea (Sr. Jens Wegner) elaboró un proyecto de orientación acerca de la fuente del material de reproducción o multiplicación y convino en presentar dicho documento, que se reproduce en el Anexo I del presente documento, a todos los Grupos de Trabajo Técnico en 2013.

EXAMEN POR LOS GRUPOS DE TRABAJO TÉCNICO EN 2013

6. El TWO, el TWF, el TWV, el TWC y el TWA examinaron la propuesta de orientación acerca de la fuente del material de reproducción o multiplicación, elaborada por un experto de la Unión Europea, que se recoge en la Sección IV "*Guidance for drafting Test Guidelines*" (Orientaciones para elaborar directrices de examen), de los Anexos de los documentos TWO/46/10, TWF/44/10, TWV/47/10, TWC/31/10 y TWA/42/10 (véanse los párrafos 22 y 23 del documento TWO/46/29 "*Report*", los párrafos 25 a 27 del documento TWF/44/31 "*Report*", los párrafos 25 a 27 del documento TWV/47/34 "*Report*", los párrafos 23 y 24 del documento TWC/31/32 "*Report*", y los párrafos 24 a 26 del documento TWA/42/31 "*Report*") y se reproduce en el Anexo I del presente documento.

7. El TWO convino en que no es conveniente tratar de incluir texto estándar adicional acerca de la fuente del material de reproducción o multiplicación en el apartado 9.2 del cuestionario técnico. No obstante, el TWO señaló que el documento proporciona información útil sobre los efectos de la fuente del material de reproducción o multiplicación, y pidió que se elabore una versión resumida como fuente de orientación general para los redactores de las directrices de examen, a fin de incluirla en el documento TGP/7.

8. El TWF señaló que el documento proporciona información útil sobre los efectos de la fuente del material de reproducción o multiplicación en tanto que orientación general para los redactores de las directrices de examen, a fin de incluirla en el documento TGP/7, y pidió al experto de la Unión Europea que elabore una versión resumida del texto que se presentará al TWF en su cuadragésima quinta sesión, en 2014.

9. El TWF invitó a un experto de España a presentar, en la cuadragésima quinta sesión del TWF, una ponencia sobre la experiencia práctica en la utilización de material obtenido por multiplicación *in vitro* en el examen DHE o en planes de certificación.

10. El TWV señaló que el documento proporciona información útil sobre los efectos de la fuente del material de reproducción o multiplicación en tanto que orientación general para los redactores de las directrices de examen, a fin de incluirla en el documento TGP/7, y pidió al experto de la Unión Europea que elabore, con asistencia de expertos de Francia y los Países Bajos, una versión resumida del texto que se presentará al TWV en su cuadragésima octava sesión, en 2014.

11. El TWV solicitó que se añadan ejemplos de hortalizas de multiplicación vegetativa.

12. El TWC señaló que el documento proporciona información útil sobre los efectos de la fuente del material de reproducción o multiplicación, y suscribió la petición de que se elabore una versión resumida como fuente de orientación general para los redactores de las directrices de examen, a fin de incluirla en el documento TGP/7.

13. El TWC solicitó al redactor que elimine la referencia a la Wikipedia para que en las referencias figuren únicamente fuentes fiables de información.

14. El TWA coincidió con el TWO en que no es conveniente tratar de incluir texto estándar adicional acerca de la fuente del material de reproducción o multiplicación en el apartado 9.2 del cuestionario técnico. El TWA señaló que el documento proporciona información útil sobre los efectos de la fuente del material de

reproducción o multiplicación en tanto que orientación general para los redactores de las directrices de examen, a fin de incluirla en el documento TGP/7, y pidió al experto de la Unión Europea que elabore, con asistencia de expertos de Francia y los Países Bajos, una versión resumida del texto que se presentará al TWA en su cuadragésima tercera sesión, en 2014. El TWA tomó nota de los efectos de la fuente del material de reproducción o multiplicación en cultivos agrícolas, como la papa/patata, que han de tenerse en cuenta en el examen DHE.

15. El TWA observó que las cuestiones que se plantean en el documento TWA/42/10 no se refieren al uso intencionado de productos químicos (por ejemplo, retardadores del crecimiento) en todas las variedades incluidas en el ensayo DHE. El TWA recordó que las cuestiones generales se abordan en el siguiente párrafo del 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 párrafo 2.5.3 del capítulo 2 del documento TG/1/3):

“La expresión de uno o varios caracteres de la variedad puede estar influenciada por factores como las plagas y las enfermedades, el tratamiento químico (por ejemplo, los retardadores del crecimiento o pesticidas), efectos del cultivo de tejido, distintos portainjertos, púas de injerto extraídas de distintas fases de crecimiento de un árbol, etc. En algunos casos (por ejemplo, la resistencia a las enfermedades) se utiliza intencionalmente la reacción a ciertos factores como carácter en el examen DHE (véase el párrafo 4.6.1). No obstante, cuando el factor no se destina al examen DHE hay que velar porque su influencia no distorsione el examen DHE. En consecuencia, en función de las circunstancias, la autoridad examinadora deberá cerciorarse de que:

- a) ninguna de las variedades objeto de examen presenta esos elementos o,
- b) todas las variedades incluidas en el examen DHE, incluidas las variedades notoriamente conocidas, están sujetas al mismo elemento y que dicho elemento tiene el mismo efecto en todas las variedades o,
- c) en los casos en que aún podría llevarse a cabo un examen satisfactorio, los caracteres afectados quedan excluidos del examen DHE, salvo que pueda determinarse la expresión verdadera del carácter del genotipo de la planta, a pesar de la presencia de dicho elemento.”

El TWA recordó asimismo la orientación que se ofrece en el documento TGP/12 “Orientación sobre ciertos caracteres fisiológicos”.

PROPUESTA

16. A partir de las observaciones formuladas por los TWP en 2013, el experto de la Unión Europea elaboró una versión resumida del proyecto de orientación acerca de la fuente del material de reproducción o multiplicación, que se expone en el Anexo II del presente documento. El texto propuesto para su inclusión como nueva nota orientativa sobre la calidad del material en una futura revisión del documento TGP/7 se recoge en la Sección IV del Anexo II.

17. En su reunión celebrada en Ginebra los días 8 y 9 de enero de 2014, el TC-EDC concluyó que, como primera medida para la elaboración de orientaciones, sería conveniente invitar a expertos a las sesiones de los TWP del año 2014 para que relaten su experiencia respecto a las fuentes del material de reproducción o multiplicación y al modo de abordar los problemas que pueden presentarse. A partir de esa información se podrían elaborar orientaciones que reflejen prácticas correctas.

18. Se invita al TC a instar a los expertos a que expongan a los TWP, en sus sesiones de 2014, su experiencia respecto a las fuentes del material de reproducción o multiplicación para el examen DHE, con objeto de elaborar orientaciones que reflejen prácticas correctas.

[Siguen los Anexos]

FUENTE DEL MATERIAL DE REPRODUCCIÓN O MULTIPLICACIÓN (propuesta presentada a los Grupos de Trabajo Técnico en 2013)

I. INTRODUCCIÓN

En horticultura se utiliza una gran diversidad de métodos de multiplicación vegetativa. Los métodos empleados más habitualmente en el ámbito comercial son los siguientes:

- esquejes de madera tierna,
- esquejes de madera dura,
- esquejes de hoja,
- división de rizomas o de matas,
- estolones,
- bulbos hijos,
- micropropagación,
- injertos.

Algunos métodos, como los esquejes de hoja, solo pueden utilizarse en unos pocos cultivos (por ejemplo, gesneriáceas, *Begonia*, *Sansevieria* no variegada). Los esquejes de hoja no ocasionan complicaciones en el examen DHE, pues suelen utilizarse en todas las variedades de los pocos cultivos en los que se pueden aplicar. Por ello, no es necesario profundizar aquí en este método. Lo mismo puede decirse de los cultivos que se multiplican eficazmente mediante estolones (por ejemplo, *Fragaria*) o bulbos hijos (por ejemplo, *Tulipa*). Sin embargo, los cultivos que se multiplican mediante esquejes de madera tierna o de madera dura o por injerto pueden provocar complicaciones en el examen DHE.

La micropropagación puede emplearse como técnica alternativa a los métodos mencionados, o bien como único método de interés comercial para la reproducción o multiplicación de algunos cultivos (por ejemplo, orquídeas y bromeliáceas). Hoy en día, la micropropagación y otras diversas técnicas *in vitro* son de uso habitual en el fitomejoramiento (por ejemplo, rescate de embriones) y para la producción de plantas exentas de virus, la multiplicación de plantas (a gran escala) y el acondicionamiento para la reproducción o multiplicación (por ejemplo, rejuvenecimiento). Todos estos métodos y técnicas pueden ejercer una repercusión directa o efectos tardíos en el fenotipo y, por consiguiente, pueden influir en el examen DHE. En el presente documento, el término “micropropagación” se emplea con el mismo significado que los términos de uso habitual (técnicas *in vitro*, cultivo *in vitro* y cultivo de tejidos).

En determinados cultivos, también el origen del material de reproducción o multiplicación que se extrae de la planta madre puede influir en gran medida en el aspecto de las plantas hijas, lo cual ha de tenerse en cuenta además del método de multiplicación vegetativa.

El objetivo del presente documento es investigar de qué manera el método de reproducción o multiplicación puede afectar al resultado del examen DHE y cómo pueden evitarse decisiones equivocadas en relación con el cumplimiento de los requisitos de DHE.

II. MULTIPLICACIÓN VEGETATIVA MEDIANTE ESQUEJES

Por lo general, los esquejes se obtienen de brotes o ramas y, rara vez, de las raíces. Cada tipo de esqueje tiene un comportamiento característico: los de madera tierna enraízan y se desarrollan con mayor rapidez que los de madera dura. A diferencia de los apicales, los esquejes obtenidos de la parte central o basal de la planta carecen de dominancia apical, y las plantas resultantes son comparables a plantas sometidas a pinzamiento o recorte, con múltiples ramificaciones, por lo que previsiblemente presentarán una correlación directa entre su tamaño y el número de ramificaciones adventicias. El tipo de esqueje utilizado para la multiplicación de la planta resulta fundamental a la hora de evaluar caracteres como “número de ramificaciones” “anchura de la planta” “densidad de la planta”, etcétera.

Si todas las variedades de un cultivo determinado se multiplican mediante el mismo tipo de esqueje, no es necesario prever ningún efecto en el examen DHE. Las plantas procedentes de esquejes de la parte central del tallo pueden ser comparables a plantas procedentes de esquejes apicales si estas últimas han sido objeto de pinzamiento en alguna ocasión.

En la mayoría de las plantas herbáceas, el origen del material de reproducción o multiplicación que se extrae de la planta madre tiene mayor repercusión a efectos de una multiplicación eficiente (a gran escala) que a efectos de la comparabilidad de las muestras en el examen DHE. En determinadas plantas leñosas,

sin embargo, esta cuestión puede ser de crucial importancia: debe tenerse en cuenta la influencia de la topófisis y la ciclófisis en el esqueje, ya que estos fenómenos no solo afectan a la capacidad de enraizamiento, sino también al porte de la planta y a su capacidad de ramificación y floración.

Cuando se utilizan ramas de plantas de crecimiento ortótropo de una variedad para producir plantas de crecimiento plagiótropo (por ejemplo, *Abies*, *Araucaria*, *Picea* y *Pseudotsuga*), estas no deben considerarse nuevas variedades sino, meramente, diferentes formas de variedades existentes. Del mismo modo, cuando una planta plagiótropa produce ocasionalmente ramas basales de crecimiento ortótropo, estas no deben considerarse ramas fuera de tipo.

Las plantas plagiótropas pueden ser de gran valor ornamental y es posible que sean las únicas que se comercialicen. Si no se dispone de plantas ortótropas de la variedad para efectuar la comparación y si no se trata de una variedad sino, por ejemplo, solo de una única planta (véase el párrafo 5 del documento UPOV/EXN/VAR), el examen DHE habrá de realizarse con el tipo plagiótropo.

En especies en las que se conocen los efectos de la topófisis y la ciclófisis, deberá indicarse en las directrices de examen correspondientes cuál es el material que ha de evaluarse en el ensayo DHE, así como el origen de aquel material de reproducción o multiplicación que se extraiga de la planta madre. Los obtentores y los proveedores del material de referencia deberán facilitar todos los detalles, posiblemente respondiendo a preguntas específicas que habrán de incluirse en el cuestionario técnico.

III. EFECTOS DEL CULTIVO *IN VITRO*

El cultivo *in vitro* puede afectar a la expresión de casi cualquier carácter. Se han descrito alteraciones morfológicas y funcionales relacionadas con el enraizamiento, el porte, la floración y la fructificación. Los problemas a los que suelen enfrentarse los encargados del examen DHE incluyen, entre otros, crecimiento desigual de las plantas, ramificación atípica (pérdida de la dominancia apical), brotes de crecimiento estancado o excesivo, pérdida o aparición de variegación en las hojas y floración escasa.

Estas alteraciones pueden ser temporales o permanentes. Las alteraciones permanentes que tienen lugar durante el cultivo de tejidos pueden deberse a la activación de transposones, a la segregación de quimeras o a una mutación “ordinaria” (ya que también puede producirse *ex vitro* en cualquier momento). Las plantas que experimentan una alteración permanente ya no pertenecen a la variedad inicial y, por lo tanto, deben considerarse fuera de tipo (véase el documento TGP 10/1, sección 4: “Evaluación de la homogeneidad sobre la base de las plantas fuera de tipo”). Análogamente, la variación epigenética (por ejemplo, por metilación) que se produce en el cultivo de tejidos (o *ex vitro*) —a menudo como efecto secundario de la transformación genética— da lugar a la expresión de caracteres que no se corresponden con el genoma. Si este fenómeno solo afecta a plantas individuales, estas no podrían considerarse fuera de tipo. Pero, si afecta a todas las plantas de una determinada “variedad”, no debe concederse título de protección, pues la expresión de los caracteres en cuestión carece de base genética. La diferenciación de estos dos casos puede representar una dificultad para los encargados del examen DHE. En el primer caso, la muestra tendría que considerarse no apta para la realización del examen DHE. En el segundo caso, si se ha determinado erróneamente que se cumple el requisito de distinción, será necesario proceder a la anulación del derecho concedido.

Causas de los efectos del cultivo *in vitro*

Cuando el material vegetal —ya sean plantas enteras, partes de plantas, células individuales, grupos de células (por ejemplo, un callo), protoplastos o semillas— se cultiva *in vitro*, siempre se utiliza un determinado medio de cultivo. Entre otros componentes, los medios de cultivo contienen reguladores del crecimiento (fitohormonas). La composición exacta del medio de cultivo y los reguladores del crecimiento que se empleen dependerán del objetivo del cultivo *in vitro*. Además de los reguladores del crecimiento que se añaden en el laboratorio, las plantas también los producen por sí mismas.

Tamaño del explante

Aparte de los reguladores del crecimiento, las diferencias entre las plantas obtenidas por multiplicación *in vitro* y las obtenidas mediante reproducción o multiplicación convencional tienen otras causas. Por lo general, los microesquejes que se transfieren a un sustrato de enraizamiento *ex vitro* son considerablemente más pequeños que los esquejes convencionales, sufren mayor estrés a consecuencia del trasplante y precisan más tiempo para lograr el mismo grado de desarrollo. Estas diferencias pueden revestir particular importancia cuando se comparan plantas obtenidas por micropropagación con plantas procedentes de la división de rizomas, bulbos o tubérculos, ya que estos órganos contienen una importante

reserva de nutrientes que permite un rápido crecimiento tras la siembra. El encargado del examen DHE debe cerciorarse de que las plantas de todas las variedades del ensayo presentan el mismo estado de desarrollo y disponen de reservas similares de nutrientes (por ejemplo, plantas jóvenes con tubérculos frente a esquejes enraizados que aún no han desarrollado tubérculos).

Régimen de luz

Por otra parte, el cultivo de plantas *in vitro* se realiza con luz artificial y, generalmente, se emplea un fotoperíodo largo. Esta puede ser la causa de la escasa floración que en ocasiones se observa en las plantas obtenidas por micropropagación.

Fitohormonas

Las fitohormonas influyen en casi todos los aspectos del desarrollo de la planta. El efecto de las fitohormonas (así como el sentido del efecto, ya que este puede ser positivo o inhibitorio) no depende únicamente de su concentración, sino también de la de otras hormonas. *Ex vitro*, las plantas producen todas las hormonas por sí mismas, lo cual no las impide reaccionar ante las de aplicación externa.

Se distinguen cinco clases de fitohormonas: auxinas, citocininas, ácido abscísico, giberelinas y etileno. Las cuatro primeras clases están formadas por muchas sustancias químicas diferentes que presentan distintas estructuras pero producen efectos parecidos; pueden variar de una especie vegetal a otra. Además, existen numerosos productos sintéticos que ejercen similares efectos en el desarrollo vegetal.

Número de subcultivos

Se han formulado observaciones controvertidas sobre la repercusión del número de subcultivos (ciclos de reproducción o multiplicación) *in vitro* en el fenotipo de las plantas tras el trasplante. Cuando el cultivo de tejido va acompañado de un rejuvenecimiento del explante, el rejuvenecimiento del tejido aumentará con cada subcultivo hasta llegar a ser completo. Este efecto se observa especialmente en plantas cuyas formas juveniles y adultas presentan aspectos diferentes. El rejuvenecimiento puede ser deseable de cara a la producción comercial, ya que permite multiplicar las plantas empleando esquejes en lugar de injertos. En las especies cuyas formas juveniles no son diferentes de las adultas, el número de subcultivos puede no tener ninguna influencia.

Método de multiplicación in vitro

Las plántulas procedentes del cultivo de tejido pueden presentar distinto comportamiento en función del modo de multiplicación: los esquejes apicales procedentes de cultivo *in vitro* probablemente se desarrollarán como esquejes apicales normales, mientras que los explantes procedentes de la división de matas probablemente se desarrollarán como plantas con múltiples ramificaciones. Concretamente, cuando se pretende obtener esquejes apicales, si se realizan cortes demasiado profundos en la mata o si esta se divide en porciones con distinto número de tallos, es probable que las plantas regeneradas muestren posteriormente un desarrollo desigual, por lo que pueden presentar una correlación inversa entre su tamaño y el número de ramificaciones.

Transposones

Por último, mediante la activación de transposones pueden obtenerse variedades que superen un primer examen DHE. No obstante, la estabilidad de dichas variedades no debe darse por sentada. Deberá efectuarse una verificación técnica de las variedades protegidas siempre que las leyes nacionales de derechos de obtentor contemplen tal posibilidad.

Información suministrada por los solicitantes que ha de tenerse en cuenta en el examen DHE

Los obtentores suelen subcontratar la reproducción o multiplicación por cultivo de tejidos a laboratorios especializados. Aunque, en la mayor parte de los casos, se utiliza el medio clásico MS (un medio de cultivo que debe su nombre a Murashige y Skoog), modificado según las necesidades específicas del cultivo y la experiencia del laboratorio, es poco probable que los laboratorios profesionales estén dispuestos a revelar su composición exacta, puesto que se considera un secreto comercial. Por lo tanto, no puede esperarse que el obtentor proporcione al examinador información detallada sobre los reguladores del crecimiento aplicados a las plantas (o a sus plantas madres) en el ensayo DHE. Aparte de la desproporcionada carga administrativa que supondría para el solicitante la presentación de dicha información, esta resulta de poca utilidad para el examinador, ya que los efectos pueden ser muy complejos y, a menudo, circunstanciales. Así pues, la influencia del cultivo *in vitro* es difícilmente previsible de cara al diseño del examen DHE. Sin

embargo, sí puede ser importante, a efectos del examen DHE, indicar si la variedad candidata procede de cultivo *in vitro*. Pueden darse las tres situaciones siguientes:

Situación nº 1: El cultivo de tejidos es el método habitual de reproducción o multiplicación, lo que significa que todas las variedades que se producen a escala comercial se multiplican *in vitro*. El material vegetal destinado al examen DHE —las variedades candidatas y las de referencia— llega directamente del laboratorio, sin reproducción o multiplicación intermedia. Aunque la influencia del cultivo *in vitro* en el fenotipo puede ser de suma importancia, su repercusión en el examen DHE puede no ser mayor que la de las distintas fuentes del material vegetal a efectos de su comparación.

Ejemplo: *Phalaenopsis*

Situación nº 2: Las antecesoras lejanas o las plantas de élite han sido objeto de cultivo de tejidos, lo que significa que se han llevado a cabo varios ciclos de reproducción o multiplicación *ex vitro* antes de que el material vegetal se someta al examen DHE. En este caso, cabe suponer que el material vegetal no presenta ya ninguno de los eventuales efectos tardíos del cultivo *in vitro*.

Ejemplo: *Pelargonium*

Situación nº 3: El cultivo de tejidos no es el único método de reproducción o multiplicación a escala comercial. El material vegetal destinado al ensayo DHE —las variedades candidatas y las de referencia— se ha obtenido por diferentes métodos: unas plantas proceden directamente del cultivo de tejidos, o bien son sus descendientes directos, y otras se han obtenido mediante reproducción o multiplicación convencional. Tal combinación de material en el ensayo puede dar lugar a una decisión errónea sobre el cumplimiento del requisito de distinción, así como a descripciones distorsionadas de las variedades. Las consecuencias para el examen DHE se detallan en el apartado 2.3.

Ejemplo: *Rhododendron*

Consecuencias de cara a la realización del examen técnico DHE

Variación intramuestral

Si la variación intramuestral es atribuible a la multiplicación *in vitro*, no se puede adoptar una decisión sobre el cumplimiento del requisito de homogeneidad. Incumbe a la autoridad examinadora decidir si se rechaza la muestra por no ser apta para el examen DHE o si se prosigue la multiplicación del material vegetal hasta que desaparezcan los efectos del cultivo *in vitro*. En algunos casos se puede lograr un desarrollo homogéneo mediante el recorte de las plantas. No obstante, en ocasiones puede ser suficiente prolongar el examen técnico, realizando otro ciclo de cultivo.

Plantas rejuvenecidas

Los examinadores deben tener en cuenta que ciertas especies vegetales presentan caracteres que son claramente diferentes, desde el punto de vista morfológico, en individuos juveniles y adultos (por ejemplo, la forma de la hoja de *Hedera helix*) y pueden transmitirse a las plantas hijas. En otras especies no es posible realizar tal distinción respecto a los caracteres morfológicos pero sí respecto a los fisiológicos (por ejemplo, la capacidad de enraizamiento de los esquejes de *Syringa vulgaris*), que influyen a su vez en el desarrollo posterior. Por consiguiente, los examinadores deben asegurarse de que todas las descripciones de variedades se efectúan a partir de plantas que tienen la misma edad fisiológica (normalizada).

Efectos tardíos de las fitohormonas sintéticas aplicadas durante la micropropagación

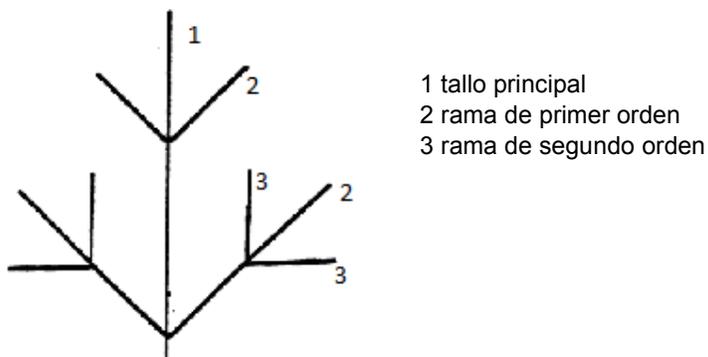
Cuando las plántulas obtenidas mediante cultivo de tejidos se transfieren a un sustrato de crecimiento *ex vitro*, aún contienen cantidades residuales de fitohormonas sintéticas, procedentes del medio de cultivo *in vitro*, que siguen afectando al desarrollo de la planta. La duración de estos efectos tardíos no depende de la cantidad absoluta de fitohormonas sintéticas residuales presentes en la planta, sino de su concentración en los tejidos y de la concentración de las hormonas producidas por la propia planta. La concentración va disminuyendo a medida que la planta continúa desarrollándose, pero la ulterior reproducción o multiplicación *ex vitro* no reduce por sí sola los efectos tardíos del cultivo de tejidos. Los esquejes obtenidos poco después de la finalización del cultivo de tejidos presentan concentraciones de fitohormonas sintéticas residuales mucho mayores que las de los esquejes obtenidos mucho después de la finalización del cultivo de tejidos (siempre que estas plantas hayan experimentado un crecimiento vegetativo considerable). Las fitohormonas, que circulan por toda la planta, pueden acumularse durante cierto tiempo y ser liberadas posteriormente. Por lo tanto, el recorte de las plantas para lograr un desarrollo comparable en diferentes muestras es menos eficiente que la producción de nuevas plantas a partir de esquejes.

Efectos tardíos de otras condiciones de micropropagación

Cuando el material vegetal presente una floración escasa o prematura, la muestra debe considerarse no apta para el examen DHE. Incumbe a la autoridad examinadora rechazar la muestra o subsanar la deficiencia, bien mediante el recorte de las plantas o bien realizando un nuevo ciclo de cultivo. Si la presencia de estos efectos es uniforme en todas las plantas de una variedad determinada, resultará difícil detectar en un solo ciclo de cultivo la influencia perturbadora del cultivo *in vitro* en el ensayo DHE.

IV. ORIENTACIONES PARA ELABORAR DIRECTRICES DE EXAMEN

En el caso de variedades de reproducción o multiplicación convencional *ex vitro*, puede ser necesario indicar en las directrices de examen —especialmente en las de variedades que no se vayan a podar durante el ensayo en cultivo— el tipo de esquejes que ha de utilizarse para producir la muestra destinada al ensayo DHE. Podría proponerse la inclusión, en el documento TGP/9 “Examen de la distinción”, de un capítulo acerca del material que se ha de utilizar en el examen DHE. En el caso de cultivos en los que se conocen los efectos de la topófisis y la ciclófisis, los requisitos que ha de cumplir el material de reproducción o multiplicación, incluido el origen del material que se extraiga de la planta madre, deben ser particularmente prescriptivos para que las variedades puedan compararse. El cuestionario técnico debe incluir preguntas que permitan al examinador determinar si el material vegetal multiplicado por el solicitante para la explotación comercial de la variedad resulta adecuado para la realización del examen DHE o si debe suministrarse otro material, del mismo modo que en el ejemplo del documento TG/96/4 (*Picea abies* (L.) Karst.), en cuyo apartado II “Material necesario”, se especifica lo siguiente: “*Preferentemente, el material vegetal proporcionado ... no deberá haberse obtenido mediante reproducción o multiplicación in vitro. Si las plantas están injertadas, deberá indicarse el portainjerto utilizado. Las púas deberán seleccionarse de tal modo que se eviten las expresiones causadas por las reacciones de topófisis*”. En el cuestionario técnico sólo se pide a los solicitantes que indiquen si la variedad se ha originado como una plántula o si es resultante de una mutación o un descubrimiento. Cuando se trate de una mutación o un descubrimiento, se propone pedir a los solicitantes que indiquen de qué parte de la planta madre se ha obtenido el material inicial de la variedad candidata (por ejemplo, señalando la ramificación pertinente en un dibujo). A continuación se muestra el dibujo empleado en el capítulo VIII del documento TG/96/4, modificado para este fin:



En cuanto al material obtenido por micropropagación, en las directrices de examen puede especificarse si dicho material vegetal es apto para el examen DHE. En variedades en las que el cultivo de tejidos no sea el único método empleado para la reproducción o multiplicación, los solicitantes, en lugar de detallar la composición del medio de cultivo, deben especificar —por ejemplo, en el cuestionario técnico— cuáles han sido las generaciones de plantas sometidas a cultivo de tejidos. El apartado 9.2 del cuestionario técnico podría modificarse del modo siguiente (las modificaciones se indican en *cursiva*):

“9.2 El material vegetal deberá estar exento de todo tratamiento que afecte la expresión de los caracteres de la variedad, salvo autorización en contra o solicitud expresa de las autoridades competentes. Si el material vegetal ha sido tratado, se deberá indicar en detalle el tratamiento aplicado. Por consiguiente, sírvase indicar a continuación si, a su leal saber y entender, el material vegetal que será examinado ha estado expuesto a:

- a) Microorganismos (por ejemplo, virus, bacterias, fitoplasma) Sí [] No []
- b) Tratamiento químico (por ejemplo, retardadores del crecimiento, pesticidas) Sí [] No []
- c) Cultivo de tejido (*marque la casilla correspondiente*):
- i) *el material vegetal que ha de examinarse proviene de micropropagación* []
- ii) *el material vegetal que ha de examinarse proviene de multiplicación o reproducción ex vitro, pero las plantas madre han sido sometidas a cultivo de tejidos* []
- iii) *el material vegetal que ha de examinarse, así como las plantas antecesoras directas, provienen de multiplicación o reproducción ex vitro, aunque las antecesoras lejanas (por ejemplo, el material de élite) han sido sometidas a cultivo de tejidos* []
- iv) *ni el material vegetal que ha de examinarse ni ninguna de las plantas antecesoras han sido sometidos a cultivo de tejidos* []
- d) Otros factores Sí [] No []

Si ha contestado afirmativamente a alguna de las preguntas sírvase suministrar detalles.

”

En las directrices de examen de aquellas especies en las que se utilice el cultivo de tejidos se podría prever la posibilidad de realizar más de un ciclo de cultivo de manera habitual, gracias a lo cual el examinador podría detectar la micropropagación no declarada y, además, podrían desaparecer los efectos tardíos del cultivo de tejidos, con lo que se reduciría el riesgo de tomar una decisión equivocada con respecto a la distinción.

Bibliografía

Bhat, S.R. y Srinivasan, S. (2002): Molecular and genetic analysis of transgenic plants: Considerations and approaches. *Plant Science* 163: 673-681

Fouad, M., Swartz, H.J. y Buta, G. (1991): The role of abscisic acid and plant growth regulators in tissue culture-induced rejuvenation of strawberry ex vitro. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25: 75-84

Jesch, H.-H. y Plietzsch, A. (2000): Langzeit-Leistungsprüfung in vitro vermehrter Ziergehölze (Prunus). I. Morphologische Merkmale. *Gartenbauwissenschaft* 65: 203-2012

Jesch, H.-H. y Plietzsch, A. (2001): Langzeit-Leistungsprüfung in vitro vermehrter Ziergehölze (Prunus). II. Phänologische und physiologische Merkmale. *Gartenbauwissenschaft* 66: 61-67

Klaehn, F.U.: The relation of vegetative propagation to topophysis, cyclophysis and periphysis in forest trees.

Krüssmann, G. (1997): Die Baumschule, 6ª edición. Parey, Berlín.

Murashige T. y Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497

Ochatt, S.J., Pontécaille, C. y Rancillac, M. (2000): The growth regulators used for bud regeneration and shoot rooting affect the competence for flowering and seed set in regenerated plants of protein peas. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*; *Plant* 36: 188-193

Smith, M.K. y Hamill, S.D. (1996): Field evaluation of micropopagated end conventionally propagated ginger in subtropical Queensland. *Austr. J. of Experimental Agriculture* 36: 347-54

Waldenmaier, S. y Bünemann, G. (1991): Ex vitro effects in micropropagation of *Syringa* L.; *Acta Horticulturae* 300

Wikipedia: Plant hormone: en.wikipedia.org/wiki/Plant_hormone

[Sigue el Anexo II]

FUENTE DEL MATERIAL DE REPRODUCCIÓN O MULTIPLICACIÓN

I. INTRODUCCIÓN

En horticultura y en algunos cultivos agrícolas se utiliza una gran diversidad de métodos de multiplicación vegetativa. Los métodos empleados más habitualmente en el ámbito comercial son los siguientes:

- esquejes de madera tierna,
- esquejes de madera dura,
- esquejes de hoja,
- división de rizomas o de matas,
- estolones,
- bulbos hijos y bulbillos,
- micropropagación (también denominada “técnicas *in vitro*” “cultivo *in vitro*” o “cultivo de tejidos”; en el presente documento, todos estos términos se emplean con el mismo significado),
- injertos,
- (mini- o micro-) tubérculos.

El método de reproducción o multiplicación puede afectar directamente al aspecto de las plantas, lo cual puede complicar el examen DHE de cultivos en los que se empleen diferentes métodos de reproducción o multiplicación, especialmente en el primer ciclo de cultivo. Asimismo, en determinados cultivos, también el origen del material de reproducción o multiplicación que se extrae de la planta madre puede influir en gran medida en el aspecto de las plantas hijas, lo cual ha de tenerse en cuenta además del método de multiplicación vegetativa. Cuando se han de comparar variedades de multiplicación vegetativa con variedades de reproducción sexual, pueden presentarse complicaciones adicionales.

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 párrafo 2.5.3 del capítulo 2 del documento TG/1/3), se establece lo siguiente:

“La expresión de uno o varios caracteres de la variedad puede estar influenciada por factores como las plagas y las enfermedades, el tratamiento químico (por ejemplo, los retardadores del crecimiento o pesticidas), efectos del cultivo de tejido, distintos portainjertos, púas de injerto extraídas de distintas fases de crecimiento de un árbol, etc. En algunos casos (por ejemplo, la resistencia a las enfermedades) se utiliza intencionalmente la reacción a ciertos factores como carácter en el examen DHE (véase el párrafo 4.6.1). No obstante, cuando el factor no se destina al examen DHE hay que velar porque su influencia no distorsione el examen DHE. En consecuencia, en función de las circunstancias, la autoridad examinadora deberá cerciorarse de que:

- a) ninguna de las variedades objeto de examen presenta esos elementos o,
- b) todas las variedades incluidas en el examen DHE, incluidas las variedades notoriamente conocidas, están sujetas al mismo elemento y que dicho elemento tiene el mismo efecto en todas las variedades o,
- c) en los casos en que aún podría llevarse a cabo un examen satisfactorio, los caracteres afectados quedan excluidos del examen DHE, salvo que pueda determinarse la expresión verdadera del carácter del genotipo de la planta, a pesar de la presencia de dicho elemento.”

El objetivo del presente documento es investigar de qué manera el método de reproducción o multiplicación puede afectar al resultado del examen DHE y cómo pueden evitarse decisiones equivocadas en relación con el cumplimiento de los requisitos de DHE, para lo cual se propone incluir texto estándar adicional en las directrices de examen.

II. MULTIPLICACIÓN VEGETATIVA MEDIANTE ESQUEJES

Los esquejes tienen un comportamiento característico en función de su tipo y de su origen en la planta madre, lo cual debe tenerse en cuenta a la hora de evaluar caracteres como “número de ramificaciones” “anchura de la planta” “densidad de la planta”, etcétera.

Asimismo, especialmente en determinadas plantas leñosas, ha de tenerse en cuenta la influencia de la topofisis y la ciclófisis en el esqueje, ya que estos fenómenos no sólo afectan a la capacidad de enraizamiento, sino también al porte de la planta y a su capacidad de ramificación y floración. Cuando se utilizan ramas de plantas de crecimiento ortótropo de una variedad para producir plantas de crecimiento plagiótropo (por ejemplo, *Abies*, *Araucaria*, *Picea* y *Pseudotsuga*), estas no deben considerarse nuevas variedades sino, meramente, diferentes formas de variedades existentes. Del mismo modo, cuando una planta plagiótropa produce ocasionalmente ramas basales de crecimiento ortótropo, estas no deben considerarse ramas fuera de tipo.

Las plantas plagiótropas pueden ser de gran valor ornamental y es posible que sean las únicas que se comercialicen. Si no se dispone de plantas ortótropas de la variedad para efectuar la comparación y si no se trata de una variedad sino, por ejemplo, solo de una única planta (véase el párrafo 5 del documento UPOV/EXN/VAR), el examen DHE habrá de realizarse con el tipo plagiótropo.

III. EFECTOS DEL CULTIVO *IN VITRO*

El cultivo *in vitro* puede afectar a la expresión de casi cualquier carácter. Se han descrito alteraciones morfológicas y funcionales relacionadas con el enraizamiento, el porte, la floración y la fructificación. Los problemas a los que suelen enfrentarse los encargados del examen DHE incluyen, entre otros, crecimiento desigual de las plantas, ramificación atípica (pérdida de la dominancia apical), brotes de crecimiento estancado o excesivo, pérdida o aparición de variegación en las hojas y floración escasa. Estos efectos pueden deberse al tamaño del explante, al régimen de luz utilizado, a las fitohormonas añadidas al medio de cultivo, al número de subcultivos, al método de multiplicación *in vitro*, a la activación de transposones, a la segregación de quimeras, a la variación somaclonal o a una mutación "ordinaria" (ya que también puede producirse *ex vitro* en cualquier momento).

Información suministrada por los solicitantes que ha de tenerse en cuenta en el examen DHE

Los obtentores suelen subcontratar la reproducción o multiplicación por cultivo de tejidos a laboratorios especializados. Aportar información sobre los reguladores del crecimiento empleados puede suponer una desproporcionada carga administrativa para los solicitantes y, además, puede resultar de poca utilidad para el examinador, ya que los efectos pueden ser muy complejos y, a menudo, circunstanciales. Así pues, la influencia del cultivo *in vitro* es difícilmente previsible a los efectos del diseño del examen DHE. No obstante, a efectos del examen DHE, puede ser importante indicar si la variedad candidata procede de cultivo *in vitro*. Pueden darse las tres situaciones siguientes:

Situación nº 1: El cultivo de tejidos es el método habitual de reproducción o multiplicación, lo que significa que todas las variedades que se producen a escala comercial se multiplican *in vitro*. El material vegetal destinado al examen DHE —las variedades candidatas y las de referencia— llega directamente del laboratorio, sin reproducción o multiplicación intermedia. Aunque la influencia del cultivo *in vitro* en el fenotipo puede ser de suma importancia, su repercusión en el examen DHE puede no ser mayor que la de las distintas fuentes del material vegetal a efectos de su comparación.

Ejemplo: *Phalaenopsis*

Situación nº 2: Las antecesoras lejanas o las plantas de élite han sido sometidas a cultivo de tejidos, lo que significa que se han llevado a cabo varios ciclos de reproducción o multiplicación *ex vitro* antes de que el material vegetal sea objeto de examen DHE. En este caso, cabe suponer que el material vegetal no presenta ya ninguno de los eventuales efectos tardíos del cultivo *in vitro*.

Ejemplo: *Pelargonium*

Situación nº 3: El cultivo de tejidos no es el único método de reproducción o multiplicación a escala comercial. El material vegetal destinado al ensayo DHE —las variedades candidatas y las de referencia— puede haberse obtenido por diferentes métodos: unas plantas proceden directamente del cultivo de tejidos, o bien son sus descendientes directos, y otras se han obtenido mediante reproducción o multiplicación convencional. Tal combinación de material en el ensayo puede dar lugar a una decisión errónea sobre el cumplimiento del requisito de distinción, así como a descripciones distorsionadas de las variedades. Las consecuencias para el examen DHE se detallan en el apartado siguiente.

Ejemplo: *Rhododendron*, *Asparagus*, *tomates* y *pimiento*

Consecuencias de cara a la realización del examen técnico DHE

Las alteraciones derivadas del cultivo de tejidos pueden ser temporales o permanentes. Las plantas que experimentan una alteración permanente ya no pertenecen a la variedad inicial y, por lo tanto, deben considerarse fuera de tipo (véase el documento TGP 10/1, sección 4: "Evaluación de la homogeneidad sobre la base de las plantas fuera de tipo").

Asimismo, si la variación intramuestral es atribuible a la multiplicación *in vitro*, no se puede adoptar una decisión sobre el cumplimiento del requisito de homogeneidad, pues la expresión de los caracteres no se corresponde con el genoma.

Sin embargo, si todas las plantas de una determinada "variedad" resultan afectadas por igual (a causa del rejuvenecimiento o de los efectos tardíos de las fitohormonas aplicadas y de otras condiciones de cultivo), no debe concederse título de protección, pues la expresión de los caracteres en cuestión carece de base genética. La diferenciación de estos dos casos puede representar una dificultad para los encargados del examen DHE.

En el primer caso, la muestra tendría que considerarse no apta para la realización del examen DHE (e incumbe a la autoridad examinadora decidir si se rechaza la muestra por no ser apta para el examen DHE o si se prolonga el ensayo, realizando otro ciclo de cultivo para que desaparezcan los efectos del cultivo *in vitro*). En el segundo caso, si se ha determinado erróneamente que se cumple el requisito de distinción, será necesario proceder a la anulación del derecho concedido.

IV. ORIENTACIONES PARA ELABORAR DIRECTRICES DE EXAMEN

En el documento TGP/7 "Elaboración de las directrices de examen", se ofrece texto estándar relativo a la cantidad de material vegetal necesario para el examen DHE, pero no se hace referencia a la calidad de la planta. Por consiguiente, se propone añadir una nota orientativa en la que se expliquen los posibles problemas que pueden presentarse en el ensayo en cultivo DHE en relación con la fuente del material de reproducción o multiplicación.

Esquejes (*ex vitro*):

En el caso de variedades de reproducción o multiplicación convencional *ex vitro*, puede ser necesario indicar en las directrices de examen —especialmente en las de variedades que no se vayan a podar durante el ensayo en cultivo— el tipo de esquejes que ha de utilizarse para producir la muestra destinada al ensayo DHE. Las opciones podrían ser las siguientes:

- a) *Las plantas deben provenir de esquejes apicales y no deben haber sido sometidas a pinzamiento ni a poda.*
- b) *Las plantas deben provenir de esquejes apicales y deben haber sido sometidas a pinzamiento/poda/recorte una vez/dos veces, o deben provenir de esquejes de madera tierna obtenidos de la parte central o basal de la planta madre.*
- c) *Las plantas deben provenir de esquejes de madera dura.*

En el caso de cultivos en los que se conocen los efectos de la topófisis y la ciclófisis, los requisitos que ha de cumplir el material de reproducción o multiplicación, incluido el origen del material que se extraiga de la planta madre, deben ser particularmente prescriptivos para que las variedades puedan compararse. Por ello, se propone utilizar como ejemplo la siguiente nota orientativa, tomada del documento TG/96/4 (*Picea abies* (L.) Karst.):

"...Las púas [o esquejes] deberán seleccionarse de tal modo que se eviten las expresiones causadas por las reacciones de topófisis".

Micropropagación:

En las directrices de examen de especies cuyo método de reproducción o multiplicación no sea únicamente el cultivo de tejidos, puede especificarse lo siguiente:

*"Preferentemente, el material vegetal proporcionado no deberá haberse obtenido mediante reproducción o multiplicación *in vitro*".*

En las directrices de examen de aquellas especies en las que se utilice el cultivo de tejidos se podría prever, si resulta viable, la posibilidad de realizar más de un ciclo de cultivo de manera habitual (posiblemente con reproducción o multiplicación adicional), gracias a lo cual el examinador podría detectar la micropropagación no declarada y, además, podrían desaparecer los efectos tardíos del cultivo de tejidos, con lo que se reduciría el riesgo de tomar una decisión equivocada con respecto a la distinción.

V. BIBLIOGRAFÍA

Bhat, S.R. y Srinivasan, S. (2002): Molecular and genetic analysis of transgenic plants: Considerations and approaches. *Plant Science* 163: 673-681

Fouad, M., Swartz, H.J. y Buta, G. (1991): The role of abscisic acid and plant growth regulators in tissue culture-induced rejuvenation of strawberry *ex vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25: 75-84

Jesch, H.-H. y Plietzsch, A. (2000): Langzeit-Leistungsprüfung *in vitro* vermehrter Ziergehölze (*Prunus*). I. Morphologische Merkmale. *Gartenbauwissenschaft* 65: 203-2012

Jesch, H.-H. y Plietzsch, A. (2001): Langzeit-Leistungsprüfung *in vitro* vermehrter Ziergehölze (*Prunus*). II. Phänologische und physiologische Merkmale. *Gartenbauwissenschaft* 66: 61-67

Klaehn, F.U.: The relation of vegetative propagation to topophysis, cyclophysis and periphysis in forest trees.

Krüssmann, G. (1997): *Die Baumschule*, 6ª edición. Parey, Berlín.

Murashige T. y Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497

Ochatt, S.J., Pontécaille, C. y Rancillac, M. (2000): The growth regulators used for bud regeneration and shoot rooting affect the competence for flowering and seed set in regenerated plants of protein peas. *In Vitro Cell. Dev. Biol.; Plant* 36: 188-193

Smith, M.K. y Hamill, S.D. (1996): Field evaluation of micropropagated end conventionally propagated ginger in subtropical Queensland. *Austr. J. of Experimental Agriculture* 36: 347-54

Waldenmaier, S. y Bünemann, G. (1991): *Ex vitro* effects in micropropagation of *Syringa* L.; *Acta Horticulturae* 300

[Fin del Anexo II y del documento]