



TGP/15/1

ORIGINAL: Inglés

FECHA: 24 de octubre de 2013

UNIÓN INTERNACIONAL PARA LA PROTECCIÓN DE LAS OBTENCIONES VEGETALES

Ginebra

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

DOCUMENTO TGP/15

ORIENTACIÓN SOBRE EL USO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS Y MOLECULARES
EN EL EXAMEN DE LA DISTINCIÓN, LA HOMOGENEIDAD Y LA ESTABILIDAD (DHE)

adoptado por el Consejo
en su cuadragésima séptima sesión ordinaria
el 24 de octubre de 2013

1.	INTRODUCCIÓN.....	3
2.	MODELOS DE APLICACIÓN.....	3
2.1	Marcadores moleculares ligados a caracteres (véase el Anexo 1)	3
2.2	Combinación de distancias fenotípicas y moleculares en la gestión de las colecciones de variedades (véase el Anexo 2).....	4
ANEXO 1	MODELO: MARCADORES MOLECULARES LIGADOS A CARACTERES EJEMPLO: MARCADOR GENÉTICO ESPECÍFICO PARA LA TOLERANCIA A LOS HERBICIDAS	
ANEXO 2	MODELO: COMBINACIÓN DE DISTANCIAS FENOTÍPICAS Y MOLECULARES EN LA GESTIÓN DE COLECCIONES DE VARIEDADES EJEMPLO: LÍNEAS PARENTALES EN EL MAÍZ	

1. INTRODUCCIÓN

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

1.2 El propósito del presente documento es dar orientación sobre la utilización de marcadores bioquímicos y moleculares en el examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad (DHE) a partir de los modelos que figuran en el documento UPOV/INF/18 que hayan recibido una evaluación favorable y respecto de los cuales se hayan dado ejemplos aceptados.

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

1.4 En el presente documento se utilizan las siguientes abreviaturas:

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

2. MODELOS DE APLICACIÓN

2.1 Marcadores moleculares ligados a caracteres (véase el Anexo 1)

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

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

- e) los marcadores vinculados a elementos reguladores diferentes del mismo gen que confieren la expresión del mismo carácter constituyen métodos diferentes de examen del mismo carácter.

2.1.2 El Anexo I del presente documento, “Marcador genético específico para la tolerancia a los herbicidas”, es un ejemplo del uso de marcadores moleculares ligados a caracteres.

2.2 Combinación de distancias fenotípicas y moleculares en la gestión de las colecciones de variedades (véase el Anexo 2)

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

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

- a) se cuenta con información fiable de que las distancias moleculares están suficientemente relacionadas con las diferencias fenotípicas, de modo que:
- b) el método selecciona variedades de la colección de variedades que son similares a las variedades candidatas; y
- c) el método no aumenta el riesgo de no seleccionar una variedad de la colección de variedades que sea necesario comparar con las variedades candidatas en el ensayo en cultivo.

2.2.3 El Anexo 2 del presente documento, “Combinación de distancias fenotípicas y moleculares en la gestión de las colecciones de variedades”, constituye un ejemplo del uso de la combinación de las diferencias fenotípicas y las distancias moleculares en la gestión de las colecciones de variedades.

[Siguen los Anexos]

MODELO: MARCADORES MOLECULARES LIGADOS A CARACTERES

EJEMPLO: MARCADOR GENÉTICO ESPECÍFICO
PARA LA TOLERANCIA A LOS HERBICIDAS

preparado por expertos de Francia

Ejemplo

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

2. Se propone que, en lugar de pulverizar las variedades en las parcelas (debido a la dificultad de organizarlo en los ensayos DHE estándar), se examine el carácter "tolerancia a la Fórmula X" realizando un examen para determinar la presencia de un marcador molecular *ligado* al gen. Este marcador se encuentra en una parte de la construcción genética. La construcción genética comprende todos los elementos que se insertan en la planta durante la modificación genética y, además del propio gen, contiene elementos adicionales para regular el gen una vez que se encuentre en la planta. El marcador puede localizarse en el gen, parcialmente en el gen o fuera del propio gen.

Premisas del ejemplo

3. El ejemplo se basa en las siguientes premisas:

a) El examen DHE

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

b) Fiabilidad de los vínculos

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

c) Creación de marcadores moleculares diferentes para el mismo gen

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

d) Distintos genes que producen tolerancia al mismo herbicida

Quizás sea posible crear distintos genes que confieran tolerancia a la Fórmula X. En el caso más simple, esto podría considerarse del mismo modo que los distintos marcadores para el mismo gen, es decir, los distintos genes, con sus marcadores respectivos, se considerarían como métodos diferentes para examinar el mismo carácter, a saber, la tolerancia a la Fórmula X. No obstante, es muy posible que los distintos genes posean un mecanismo químico diferente para producir la tolerancia a la Fórmula X. Por consiguiente, las sustancias químicas producidas por los distintos genes serán diferentes y dichas sustancias químicas podrán constituir la base para establecer la distinción en ciertas circunstancias. No obstante, en virtud de este modelo sería necesario en primer lugar aprobar los componentes químicos como caracteres de la UPOV, antes de aceptar marcadores moleculares vinculados a dichos caracteres potenciales. Esto podría, a su vez, constituir un ejemplo separado. Por consiguiente, se presume que distintos genes serían tratados como distintos métodos para examinar el mismo carácter, a saber, la tolerancia a la Fórmula X.

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

Es posible asimismo que puedan elaborarse distintos genes contruidos que contengan el mismo gen de tolerancia a la Fórmula X, pero que posean un control regulatorio distinto. Por ejemplo, los elementos regulatorios pueden traducirse en la tolerancia a la Fórmula X que se activan únicamente en ciertas etapas del desarrollo. En aras de la simplicidad, al considerar este ejemplo, se presume que los distintos marcadores vinculados a distintos elementos reguladores para el mismo gen se tratarán como métodos diferentes para examinar el mismo carácter de tolerancia a la Fórmula X. No obstante, cabe esperar que esta cuestión se siga examinando ulteriormente.

[Sigue el Anexo 2]

MODELO: COMBINACIÓN DE DISTANCIAS FENOTÍPICAS Y MOLECULARES EN
LA GESTIÓN DE COLECCIONES DE VARIEDADES

EJEMPLO: LÍNEAS PARENTALES EN EL MAÍZ

preparado por expertos de Francia

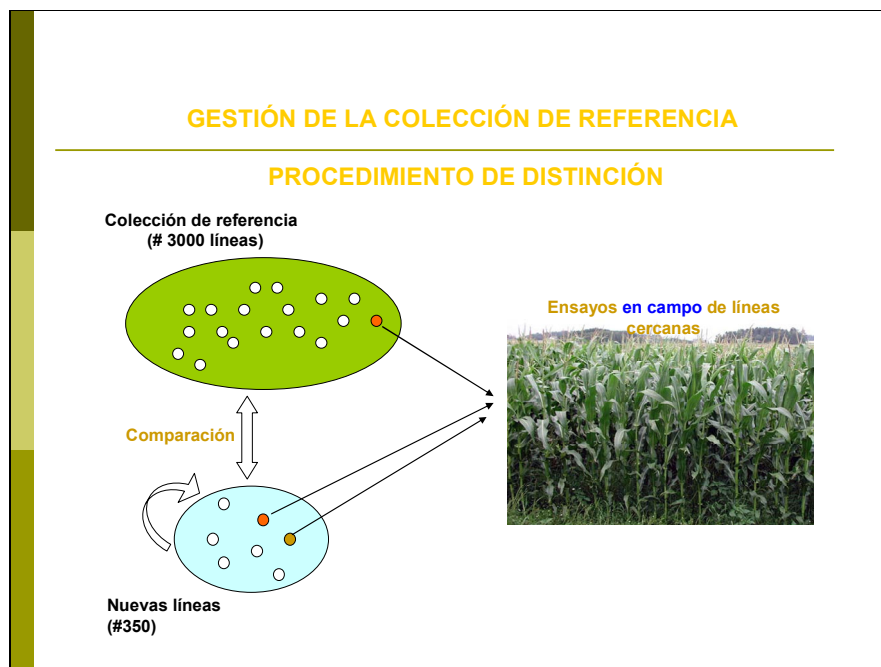
1. Descripción

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

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

- a) seleccione únicamente variedades similares a las variedades candidatas, y
- b) limite el riesgo de no seleccionar una variedad en la colección de variedades que deba compararse en cultivo, especialmente en los casos en que la colección de variedades es amplia o cara.

Gráfico 1



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

a) Estudios existentes sobre las distancias moleculares en el maíz, aplicables a los ensayos DHE y al establecimiento de derivación esencial, en los que se muestra la relación de parentesco entre variedades (véanse los documentos BMT/3/6 *"The Estimation of Molecular Genetic Distances in Maize or DUS and ED Protocols: Optimization of the Information and new Approaches of Kinship"* y BMT/3/6 Add.)

b) Un experimento llevado a cabo por GEVES en un conjunto de líneas parentales del maíz que muestra que existe un vínculo entre la evaluación de la distinción por parte de expertos (evaluación global) y la distancia molecular calculada utilizando datos moleculares de secuencias simples repetidas (SSR) (véase el gráfico 2).

1.4 Componentes del sistema

1.4.1 Distancia GAIA

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

1.4.2 Distancia molecular

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

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

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

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

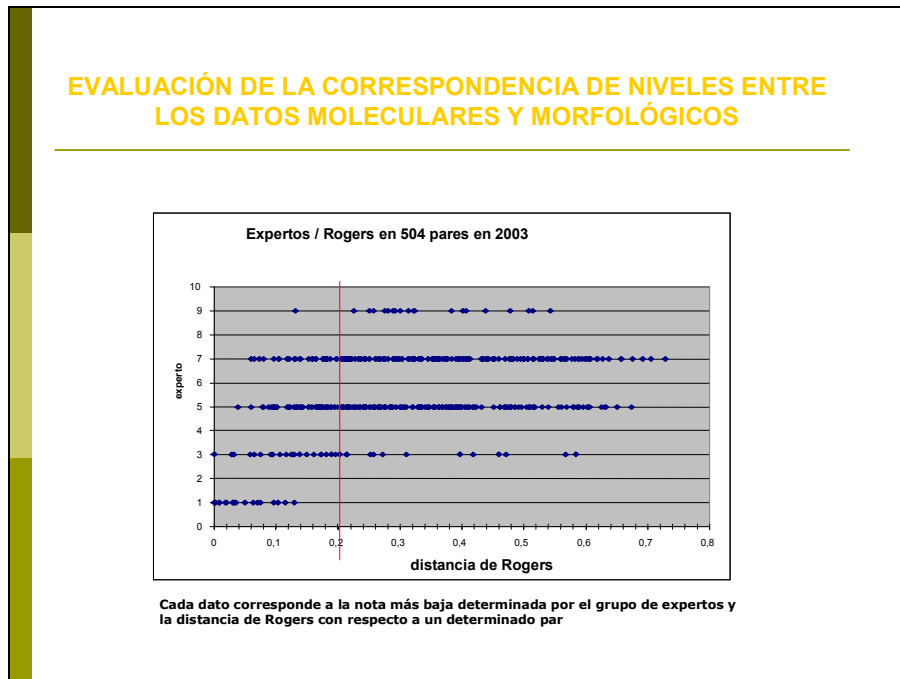
Evaluación visual por expertos en cultivos del maíz:

Escala de similitud:

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

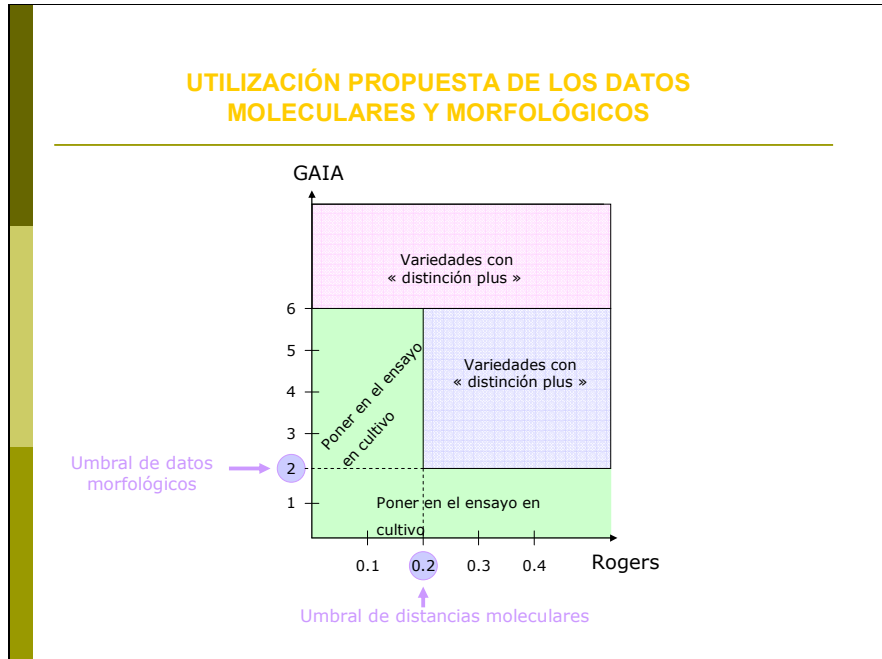
En el caso del maíz, esta evaluación mostró que ninguna línea parental con una distancia molecular superior a 0,15 fue considerada similar o muy parecida mediante evaluación por expertos en el examen DHE (véase el gráfico 2).

Gráfico 2



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

Gráfico 3



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

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

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

2. Ventajas e inconvenientes

2.1 Ventajas

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

2.2 Inconvenientes

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

[Fin del Anexo 2 y del documento]