

УДК 633.15.631.527

Н. Е. ВОЛКОВА, д. б. н., головн. наук. співроб.

СГІ–НЦНС, Одеса

e-mail: natavolki@ukr.net

МОЛЕКУЛЯРНІ МАРКЕРИ ДЛЯ ЕКСПЕРТИЗИ СОРТІВ НА ВІДМІННІСТЬ, ОДНОРІДНІСТЬ І СТАБІЛЬНІСТЬ У СИСТЕМІ UPOV

Оглянуто стан проблеми з використання молекулярних маркерів у експертизі відмінності, однорідності, стабільності сортів у рамках Міжнародного союзу з охорони нових сортів рослин (UPOV). Наведено короткий огляд документів, в яких узагальнено позицію UPOV щодо молекулярних маркерів, та критерії, які UPOV рекомендує застосовувати до маркерів при розробці методологічних підходів.

Ключові слова: молекулярні маркери, ВОС-тест, UPOV.

Згідно Закону України «Про охорону прав на сорти рослин» (п. 2 ст. 11), «сорт вважається придатним для набуття права на нього як на об'єкт інтелектуальної власності, якщо за проявом ознак, породжених певним генотипом чи певною комбінацією генотипів, він є новим, відмінним, однорідним та стабільним» [1]. Тобто, для охорони сорту необхідно чітко визначити цей сорт та забезпечити його відповідність критеріям охороноздатності: відмінності, однорідності і стабільності.

В 1961 р. підписано Міжнародну конвенцію з охорони нових сортів рослин та створено Міжнародний союз з охорони нових сортів рослин (Union pour la Protection des Obtentions Végétales, UPOV) [2]. UPOV є єдиною міжнародно гармонізованою, ефективною *sui generis* системою захисту сортів рослин. Країна, що вступає в UPOV, заявляє про свій намір охороняти права селекціонерів на основі принципів, однакових для всіх членів-учасників UPOV. Для здійснення міжнародної гармонізації охорони сортів UPOV розробив загальні принципи [3] та конкретні методики експертизи на предмет відмінності, однорідності і стабільності (ВОС) для близько 230 видів і родів рослин, якими користуються всі члени Союзу. ВОС-експертиза полягає в оцінці сорту за критеріями відмінності, однорідності і стабільності на основі визначення характерних і відмінних морфологічних, фізіологічних ознак, рівень прояву яких піддається точному опису.

Понад 10 років важливою темою дискусій як у технічних, так і юридичних аспектах у країнах-членах UPOV є можливість використання молекулярних маркерів при експертизі сортів за критеріями ВОС. У 2000 р.

UPOV створив робочу групу з використання біохімічних і молекулярних методів (*Working group on biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular, BMT*), яка констатувала необхідність широкого впровадження молекулярних маркерів у процес ВОС-експертизи. Одним з основних результатів роботи групи стало створення спеціальних *ad hoc* підгруп технічних і юридичних експертів з біохімічних і молекулярних методів з метою оцінки можливості використання цих методів у ВОС-експертизі окремих культур.

На сьогодні позиція UPOV із застосування молекулярних маркерів у ВОС-експертизі узагальнена в документах TGP/15 «Guidance on the use of biochemical and molecular markers in the examination of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS)» («Керівництво з використання біохімічних та молекулярних маркерів в експертизі відмінності, однорідності і стабільності (ВОС)» [4], UPOV/INF/18/1 «Possible use of molecular markers in the examination of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS)» («Можливе використання молекулярних маркерів в експертизі відмінності, однорідності та стабільності (ВОС)» [5] та UPOV/INF/17/1 «Guidelines for DNA-profiling: molecular marker selection and database construction («BMT Guidelines»)» («Керівництво з ДНК-профілювання: добір за молекулярними маркерами та конструювання бази даних») [6].

В документі TGP/15/1 наведено моделі можливого застосування молекулярних маркерів у ВОС-експертизі: ознако-специфічні молекулярні маркери та об'єднання фенотипових і молекулярних дистанцій в управлінні колекціями сортів. Молекулярні маркери можуть бути використані як метод перевірки ВОС-характеристик на такій основі: (1) тест проводиться на такій же кількості індивідуальних рослин, з такими ж критеріями відмінності, однорідності й стабільності, як і для визначення ознак через біоаналіз; (2) є перевірка (верифікація) надійності зв'язку між маркером і ознакою; (3) різні маркери для тієї ж ознаки вважаються різними методами для її визначення; (4) маркери, зчеплені з різними генами, пов'язаними з експресією тієї ж ознаки, є різними методами для її визначення; (5) маркери, зчеплені з різними регуляторними елементами для тих самих генів, пов'язаних з експресією тієї ж ознаки, є різними методами для її перевірки. Прикладом ознако-специфічних молекулярних маркерів в цьому документі є ген-специфічний маркер толерантності до гербіциду. Щодо другої моделі, суть її у комбінуванні фенотипових і молекулярних дистанцій задля виявлення у колекції тих сортів, які необхідно порівнювати з сортами-кандидатами в польових дослідках.

Приклади використання молекулярних маркерів, розроблених на основі мікросателітних повторів (*sequence tagged microsatellite, STMS; simple sequence repeat, SSR*), для ВОС-тестування наведені в документі UPOV/INF/18/1. Так, для тестування сортів троянди запропоновано двокрокову схему з залученням двох наборів по сім STMS-маркерів у кожному; для пшениці пропонується використання восьми SSR-маркерів.

Вищезгадані документи спрямовані на гармонізацію методологічних підходів при використанні молекулярних маркерів у всіх країнах-членах UPOV. Застосування молекулярних маркерів рекомендується UPOV за наявності відповідної технічної можливості у експерта [7].

При розробці методологічних підходів UPOV рекомендує застосовувати до маркерів такі критерії: маркери мають бути високополіморфними; результати молекулярно-генетичного аналізу сортів рослин мають бути відтворюваними, повторюваними і стабільними при використанні різних методів і обладнання як у межах однієї лабораторії, так і між лабораторіями; розподіл маркерів по геному має бути відомий («map position»). Хоч це, з одного боку, не є суттєво важливою інформацією безпосередньо для визначення відмінностей між сортами, але в той же час при виборі маркерів це дозволяє уникнути їхніх зчеплених варіантів; уникати використання, наскільки це можливо, маркерів з «нульовими алелями» (тобто алелями, які не розрізняються на молекулярному рівні за результатами полімеразної ланцюгової реакції). Це не є обов'язковим, але доцільним.

Також при доборі маркерів необхідно завбачати рівень доступності нових технологій для широкого кола експертів. Так, деякі молекулярні маркери у зв'язку з значними інвестиціями в їхнє дослідження можуть бути предметом охорони інтелектуальної власності, що лімітує їхнє використання. Ці підходи UPOV рекомендує враховувати при введенні молекулярного маркування в національні методики з ВОС-експертизи сортів.

Технічний і Консультативний комітети UPOV на своїх сесіях протягом минулого року констатували, що існує необхідність забезпечення широкого кола науковців, в тому числі селекціонерів, і громадськості в цілому, відповідною інформацією про ситуацію в UPOV відносно використання молекулярних методів. Консультативний комітет на 86 сесії (23–24.10.2013 р.) обговорив серію відповідей на актуальні питання, одне з яких стосувалося молекулярних маркерів: «Чи дозволяє UPOV молекулярні методи (профілі ДНК) в тестуванні відмінності, однорідності та стабільності («ВОС»)?» («Does UPOV allow molecular techniques (DNA profiles) in the examination of Distinctness, Uniformity and Stability («DUS»)?»), та доручив Технічному комітету підготувати проект відповідей.

Технічний комітет на 15 сесії (07–09. 04. 2014 р.) розглянув та погодив проект відповіді на запитання щодо використання молекулярних методів [8], підготовлений Розширеним редакційним комітетом Технічного комітету [9]. Консультативний комітет на 87 сесії (11.04.2014 р.) розглянув проект відповідей на це та інші типові питання. Рада UPOV на 31 позачерговій сесії (11.04.2014 р.) погодила відповіді на запитання, що найбільш часто постають [10]. Запитання та відповіді опубліковано на сайті UPOV [11]. Це є новою ініціативою в рамках комунікаційної стратегії UPOV. Щодо питання про використання молекулярних методів для ВОС-експертизи відповідь така:

«Важливо зазначити, що в окремих випадках сорти можуть мати різний профіль ДНК, але бути фенотипово ідентичні, в той час як в інших випадках сорти, що мають значні фенотипові відмінності, можуть мати однаковий профіль ДНК для певного набору молекулярних маркерів.

У зв'язку з застосуванням молекулярних маркерів, які не пов'язані з фенотиповими відмінностями, важливою є можливість використовувати необмежену кількість маркерів, щоб знайти відмінності між сортами на генетичному рівні, які не відображені в фенотипових ознаках.

На основі вище наведеного UPOV погодив такі види застосування молекулярних маркерів щодо ВОС-тестування:

(А) Молекулярні маркери можуть бути використані як метод оцінки ВОС-ознак, які відповідають критерію для набору ознак, викладених у Загальному Керівництві, якщо є надійний зв'язок між маркером і ознакою.

(Б) Поєднання фенотипових відмінностей і молекулярних дистанцій може бути використано для удосконалення добору сортів, які будуть порівнюватися у випробуванні, якщо молекулярні відстані достатньо пов'язані з фенотиповими відмінностями, а цей метод не підвищує ризику недобору сортів з колекції, які мають бути порівняними з сортами-кандидатами у ВОС-випробуванні».

Впровадження у ВОС-експертизу молекулярних маркерів підтримують такі впливові організації, як Міжнародна федерація насіння (International Seed Federation, ISF), Європейська асоціація насіння (European Seed Association), Американська асоціація з торгівлі насінням (The American Seed Trade Association, ASTA) [12–14]. Так, ISF настійно підтримує використання молекулярних маркерів для сортової ідентифікації та визначення генетичної відповідності між сортами для вирішення спірних питань авторства. ASTA також підтримує зміни, які підвищують ефективність, швидкість, інформаційний зміст чи скоротять операційні витрати на існуючі у даний час ВОС-процедури. Найбільша компанія з розробки технологій в агрономічній сфері «Proteios» (Нідерланди) вважає, що ВОС-тестування є дорогою процедурою і потребує багато часу за великого числа морфологічних ознак, які необхідно оцінити, та підтримує ідею використання молекулярних маркерів [15].

UPOV ухвалено рішення щодо проведення наради з молекулярних методів з Організацією з економічного співробітництва та розвитку (Organisation for Economic Cooperation and Development, OECD) та Міжнародною асоціацією з тестування насіння (International Seed Testing Association, ISTA) за участі інших міжнародних організацій, зокрема Міжнародної організації зі стандартизації (International Organization for Standardization, ISO). Ця нарада відбудеться в рамках 14 сесії ВМТ 10–13.11.2014 р. в Сеулі (Республіка Корея), програму наведено у документі [16].

Наукова періодика (ретроспектива — 10 років) представлена значною кількістю публікацій щодо аналізу потенціалу різних типів молекулярних маркерів для ВОС-експертизи сортів різних культур, зокрема кукурудзи [17–18], рису [19], ячменю [20–22], томатів [23]. Системи молекулярних маркерів для ідентифікації сортової належності адаптовано для основних культур, що культивуються в Беларусі: пшениця, картопля, ячмінь, льон, томат, соя, соняшник, груша, яблуня, буряки цукрові [24]. Особливо активно залучаються молекулярні маркери у ВОС-експертизу видів рослин зі слабкими міжсортowymi відмінностями (ріпак, льон та ін.). Пропозиції України щодо використання молекулярних маркерів для ВОС-експертизи, розроблені Південним біотехнологічним центром у рослинництві Національної академії аграрних наук України (зараз — відділ геноміки і біотехнології СГІ–НЦНС), ще в 2001 році представлено на Сьомій сесії ВМТ [25].

Висновки. Зростаюча кількість сортів-кандидатів, зниження їх мінливості за морфологічними ознаками сприяє надмірному зростанню витрат на визначення новизни, що викликало необхідність удосконалення діючих процедур оцінки різноманітності, особливо що стосується відмінності, однорідності, стабільності. У зв'язку з швидким розвитком молекулярних методів, використання молекулярних маркерів у ВОС-тестуванні стало предметом наукових досліджень і темою для обговорення в UPOV. На даний час позиція UPOV щодо використання молекулярних маркерів у ВОС-експертизі узагальнена в документах TGP/15/1, UPOV/INF/18/1 та UPOV/INF/17/1. У рамках комунікаційної стратегії UPOV сформовано перелік питань, які задають найбільш часто, та Радою UPOV погоджено відповіді на них, у тому числі щодо використання молекулярних методів. Протягом 2014 р. UPOV планує проведення спільних нарад з міжнародними організаціями, діяльність яких пов'язана з охороною сортів рослин, широке інформування селекціонерів та громадськості в цілому щодо використання молекулярних маркерів у ВОС-експертизі.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Закон України «Про охорону прав на сорти рослин». Із змінами, внесеними згідно із Законами № 311-V від 02.11.2006 р., № 2592-VI від 07.10.2010 р., № 5462-VI від 16.10.2012 р.
2. Act of 1991. International convention for the protection of new varieties of plants of December 2, 1961, as Revised at Geneva on November 10, 1972, on October 23, 1978, and on March 19, 1991. — 25 p.
3. General Introduction to the Examination of Distinctness, Uniformity and Stability and the Development of Harmonized Descriptions of New Varieties of Plants // UPOV document TG/1/3. — 2002. — 26 p.
4. Guidance on the use of biochemical and molecular markers in the examination of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS) // UPOV document TGP/15/1. — 2013. — 10 p.
5. Possible use of molecular markers in the examination of Distinctness, Uniformity and Stability (DUS) // UPOV document UPOV/INF/18/1. — 2011. — 26 p.

6. Guidelines for DNA-profiling: molecular marker selection and database construction (BMT Guidelines) // UPOV document UPOV/INF/17/1. — 2010. — 13 p.
7. Семашко Т. В. Современное развитие методологии использования молекулярных маркеров в испытании сортов на отличимость, однородность и стабильность (ООС) / Т. В. Семашко, В. А. Бейня // Материалы Международной научной конференции «Генетика и биотехнология XXI века: проблемы, достижения, перспективы». 08–11.10.2012 г. — Минск, Республика Беларусь, 2012. — С. 100.
8. Molecular techniques // UPOV document TC/50/13. — 2014. — 11 p.
9. Molecular techniques // UPOV document TC-EDC/Jan14/24. — 2014. — 2 p.
10. Report on the decisions adopted by the Council // UPOV document C(Extr.)/31/5. — 2014. — 18 p.
11. <http://www.upov.int/about/en/faq.html#Q2>
12. Use of DNA-based markers in testing for Distinctness, Uniformity and Stability (DUS). Position of European Seed Association // Document ESA_11.0044. — 2011. — 2 p.
13. ISF View on Intellectual Property. — 2009. — 16 p. (<http://www.worldseed.org>).
14. Position Statement on the Use of Molecular Markers in Testing for Distinctness, Uniformity and Stability (DUS). Approved by the Board of Directors of The American Seed Trade Association. — 2009 (<http://www.amseed.org>).
15. DNA Fingerprinting Methodology to Distinguish Maize Open-Pollinated Varieties (<http://www.proteios.nl>).
16. Molecular techniques // UPOV document CAJ/69/4. — 2014. — 8 p.
17. Gunjaca J. Discriminating maize inbred lines using molecular and DUS data / J. Gunjaca, I. Buhinicek, M. Jukic // Euphytica. — 2008. — V. I, № 161. — P. 165–172.
18. Yadav V. Comparative evaluation of maize inbred lines (*Zea mays* L.) according to DUS testing using morphological, physiological and molecular markers / V. Yadav, I. Singh // Agricultural Sci. — 2010. — V. 1, № 3. — P. 131–142.
19. Bonow S. Microsatellite Markers in and around Rice Genes: Applications in Variety Identification and DUS Testing / S. Bonow, E. Von Pinho, M. Vieira, B. Vosman // Crop Sci. — 2009. — V. 49. — P. 880–886.
20. Абугалиева А. И. Отличимость, однородность и стабильность сортов ячменя по морфологическим и молекулярным маркерам согласно UPOV / А. И. Абугалиева, С. О. Скокбаев, Л. М. Драчева и др. // Биотехнология. Теория и практика. — 2005. — № 1. — С. 26–39.
21. Cockram J. Evaluation of diagnostic molecular markers for DUS phenotypic assessment in the cereal crop, barley (*Hordeum vulgare* ssp. *vulgare* L.) / J. Cockram, H. Jones, C. Norris, D. O'Sullivan // Theor. Appl. Genet. — 2012. — V. 125. — P. 1735–1749.
22. Jones H. Evaluation of the use of high-density SNP genotyping to implement UPOV Model 2 for DUS testing in barley / H. Jones, C. Norris, D. Smith et al. // Theor. Appl. Genet. — 2013. — V. 126. — P. 901–911.
23. Arens P. Development and evaluation of robust molecular markers linked to disease resistance in tomato for distinctness, uniformity and stability testing / P. Arens, C. Mansilla, D. Deinum // Theor. Appl. Genet. — 2010. — V. 120. — P. 655–664.

24. Кильчевский А. В. Исследования по геномике растений в Беларуси / А. В. Кильчевский, Е. А. Сычева // Труды БГУ. — 2012. — Т. 7, ч. 1. — С. 10–21.
25. Report of Working group on biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular // UPOV document BMT/7/19. — 2001. — 36 p.

Надійшла до редакції 05.03.2014

UDC 633.15.631.527

Volkova N. E. Plant Breeding and Genetics Institute — National Center of Seed and Cultivar Investigations

MOLECULAR MARKERS FOR THE EXAMINATION OF DISTINCTNESS, UNIFORMITY AND STABILITY IN UPOV

The state of problem of molecular markers using in the examination of distinctness, uniformity and stability of the International Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV) is characterized. Overview of the documents summarized UPOV position on molecular markers, and the criteria that UPOV recommends to markers in the development of methodological approaches are given.

УДК 633.15.631.527

Волкова Н. Э.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МАРКЕРЫ ДЛЯ ЭКСПЕРТИЗЫ СОРТОВ НА ОТЛИЧИЕ, ОДНОРОДНОСТЬ И СТАБИЛЬНОСТЬ В СИСТЕМЕ UPOV

Рассмотрено состояние проблемы использования молекулярных маркеров в экспертизе отличимости, однородности, стабильности сортов в рамках Международного союза по охране новых сортов растений (UPOV). Приведены краткий обзор документов, в которых обобщена позиция UPOV по молекулярным маркерам, и критерии, которые UPOV рекомендует применять к маркерам при разработке методологических подходов.