

ДНК-ТЕХНОЛОГІЇ В РЕЄСТРАЦІЇ Й ОХОРОНІ ПРАВ НА СОРТИ РОСЛИН

Ю.М. Сиволап, академік УААН,
Н.Е. Кожухова, кандидат біологічних наук
Південний біотехнологічний центр у рослинництві УААН

Селекція рослин є одним з ефективних факторів підвищення продуктивності рослинництва. Селекційний конвеєр щорічно постачає агропромислового виробництва нові стійкіші до біотичних і абіотичних стресів сорти, лінії і гібриди рослин з поліпшеними якостями продукції. Значні досягнення в селекції привели до "зеленої революції" в рослинництві. Важливим елементом селекції і насінництва й актуальним моментом захисту авторських прав на сорти є диференціація й ідентифікація генотипів сільськогосподарських культур. В економічній ситуації, коли сорт є товаром, який має не тільки автора, а й конкретного власника, виникла потреба у створенні надійних способів визначення і реєстрації генотипів рослин.

За ДСТУ 2949-94 "Насіння сільськогосподарських культур" терміни та визначення, "сорт сільськогосподарських культур - це штучно відібрана, єдина з погляду придатності для відтворення сукупність рослин одного і того ж самого ботанічного таксону з притаманними для нього біологічними ознаками і властивостями, що характеризують їхню спадковість, яка має хоча б одну відмінність від відомих сукупностей рослин того самого ботанічного таксону."

Відповідно до Міжнародної конвенції з охорони нових сортів рослин (Женева, 1997) "сорт визначає групу рослин у рамках нижчого з відомих ботанічних таксонів, яка незалежно від того чи задовольняє повністю умовам для представлення права селекціонера може бути:

- визначена ступенем прояву ознак, що є результатом реалізації даного генотипу або їх комбінації;
- відзначена від будь-якої іншої групи рослин ступенем виразності хоч однієї з цих ознак;
- розглянута як єдине ціле з точки зору природності для відтворення в незмінному стані цілих рослин сорту".

Сорт є генотипом або комбінацією генотипів, що за своїми ознаками відрізняється від інших груп рослин. Генотип у сучасному розумінні генетики - це набір алелів, який унікально диференціює один організм або групу організмів від інших.

Визначення генотипу і диференціювання від інших здійснюється за

допомогою маркерів. Маркер, або сигнальний ген [1], використовується для визначення чіткої моделюючої ознаки, що сполучається з мінливістю іншої якісної або кількісної ознаки. Маркери можуть бути фенотиповими і генотиповими. До фенотипових відносять морфологічні і біохімічні, а до генотипових - молекулярні. Для тестування ліній, сортів і гібридів на їх відмінність між собою висувається ряд критичних вимог до маркерів, що використовуються [2].

По-перше, експресія маркера не має залежати від впливу середовища. У цьому випадку немає потреби в багаторічних повторних серіях експериментів у різних регіонах. По-друге, для максимальної диференціації маркери мусять викривати різницю між близькоспорідненими зразками (75-90% по педігрі), які схожі, але не ідентичні. По-третє, для розрахунку генетичних дистанцій між зразками, маркери повинні стійко відтворюватись. Щоб розрізнити два і більше зразків, маркери мусять характеризувати генетичне різноманіття. Традиційно сорти рослин описуються за морфологічними фенотиповими ознаками, на які значною мірою впливають умови середовища. UPOV запропонував DUS-тест. При характеристиці морфологічних ознак сорту він враховує відмінність, однорідність (одноманітність), стабільність. Вважаємо, що DUS-тест має багато недоліків і не відповідає розвиткові сучасної генетики. DUS-тест пов'язаний з використанням фенотипових ознак, необхідністю отримання цілих рослин та ін. Прояв фенотипових ознак залежить від умов середовища і досить часто потрібен досвід селекціонера для розпізнавання сортів, ліній, гібридів.

Значною проблемою є встановлення генетичної одноманітності ліній і типовості гібридів. Морфологічні порівняння в аналізі ознаки суб'активні. На них впливають кліматичні умови і рівень агротехніки, а тестування можливе лише на стадії дорослих рослин.

На засіданнях технічних комісій UPOV обговорюються питання використання молекулярних маркерів при визначенні сорту. У зв'язку з перспективами, що відкриваються молекулярною генетикою для визначення генотипів, виникає потреба в детальній оцінці можливості і необхідності використання молекулярних маркерів при ідентифікації і реєстрації сортів сільськогосподарських культур.

У 2003 р. світова громадськість відзначила півстолітній ювілей відкриття носія спадковості, молекули ДНК. У 1953 р. Уотсон і Крік запропонували дволанцюгову модель структури ДНК, завдяки якій встановлено як кодується і передається нащадкам спадкова інформація і, яким чином вона реалізується в клітині. За п'ятдесят років напруженої праці вченими пройдено шлях від досліджень структури і мінливості ДНК, що мали теоретичний характер, до

створення біотехнологій, що спричинили кардинальні зміни у фармацевтичній промисловості, медицині і сільському господарстві.

ДНК-технології в рослинництві мають два напрями - створення трансгенних рослин і використання молекулярно-генетичного поліморфізму в підвищенні ефективності традиційної селекції і насінництва.

Використання технології отримання рекомбінантних ДНК почалось із синтезу гормональних препаратів людини (соматостотіну, соматотропіну, інсуліну) і набуло найбільшого поширення при створенні генотипів рослин, стійких до гербіцидів, шкідників, агрономічно збагачених важливими генами з видів, що віддалені бар'єром несхрещуваності. США, Китай та інші країни широко використовують трансгенні рослини. У 2002 р. трансгенні кукурудза і бавовник з генами Vt висівались на 14,5 млн гектарів. У 2003 р. трансгенні рослини займали 80% площі сої, 38 - кукурудзи, 70% - бавовнику в посівах США. Країни Західної Європи, для яких характерно перевиробництво продуктів сільського господарства, і які відстали від США з розробки генно-інженерних конструкцій, не зацікавлені у відкритті свого ринку для заокеанських трансгенних сортів рослин і технологій їх вирощування. У той же час розвинені західноєвропейські країни витрачають значні кошти для досліджень у галузі генної інженерії рослин.

Учені України, які були одними з перших дослідників впливу ДНК на рослини [3], в останнє десятиріччя не отримали коштів, достатніх для розвитку генно-інженерних технологій на сучасному рівні, і вимушені були в 90-х роках практично припинити дослідження. Проблема фінансування біотехнологій в країні була підмінена обговоренням якостей трьох трансгенних сортів картоплі фірми Монсанто. Україна є одним з експортерів продукції рослинництва і невикористання сучасних біотехнологій, зокрема генної інженерії для поліпшення рослин, знижує конкурентоспроможність сортів як на внутрішньому, так і на світовому ринках.

Дослідження молекулярно-генетичного поліморфізму шляхом визначення мінливості структури ДНК сприяло модернізації традиційної селекції і відкрило нові можливості поліпшення насінництва. Історично склалась ситуація, коли дослідженням ДНК передували дослідження білків. Біохімічна генетика відкрила шляхи використання білкових маркерів у селекції рослин [4, 5]. Нині використовують два типи білків - ізоферментні системи переважно вегетативних органів і запасні білки насіння. Білкові маркери використовуються для визначення сортової типовості та рівня гібридності [6, 7, 8]. У той же час білкові маркери мають ряд суттєвих обмежень, пов'язаних з оперуванням усього кількома локусами структурних генів. Наприклад,

зеїн кукурудзи кодується 20 структурними генами, з яких 10 містяться на хромосомі 4, 9 генів на короткому плечі сьомої хромосоми і один ген - на довгому плечі хромосоми 10. У пшениці субодиниці глютеніну кодуються 14 локусами, локалізованими на довгому плечі першої гомологічної групи (1 A, 1 B, 1D). Гліадіни кодуються локусами короткого плеча цих же хромосом і хромосомами 6-ої гомологічної групи. Геліантини соняшнику кодуються шістьма локусами.

Наймінливіша і найспецифічніша частина генома знаходиться в неструктурній фракції, яка не має білкової експресії [9]. У багатьох випадках виникають проблеми з диференціації генотипів рослин за білковими маркерами. Крім того, маркірування ознак рослин білками обмежено тими ділянками генома, які їх кодують і зчеплені з ними. Експресії підлягає незначна фракція генома, тому більша його частина лишається поза зоною маркірування білками. UPOV увела обмеження, за яким застосування білкових маркерів допускається тільки у випадках наявності даних про генетичні особливості сорту чи гібрида. Таким чином, для ідентифікації і реєстрації генотипів рослин білкові маркери не можуть уважатись задовільними.

Наприкінці 20 століття завдяки досягненням молекулярної генетики виникла можливість створення іншого класу маркерів - молекулярних. Білки, хоч і є молекулами, відносяться до класу біохімічних маркерів, а ДНК - до молекулярних. Молекулярні маркери мають істотні переваги над біохімічними. Послідовності ДНК не залежать від умов середовища. Кожна клітина організму містить увесь об'єм інформації, закодованої в ДНК, що сприяє дослідженню будь-якої тканини для отримання даних про генотип. Кількість інформативних ДНК-маркерів необмежена. Важливою перевагою ДНК-маркерів є спроможність аналізу всього генома, а не тільки кодуєної частини, як у випадках з використанням білків. Перевагою молекулярних маркерів є той факт, що для визначення генотипу не потрібно вирощувати рослину до повної стиглості. Для виділення ДНК достатньо декілька клітин листка, коріння, стебла, насіння.

Особливу увагу серед ДНК-маркерів привертає система мікросателітів або SSR (simple sequence repeat). SSR-маркери кодомінантні, монолокусні, поліалельні, гіперваріабельні. SSR - це тандемно повторювані прості послідовності довжиною повторення 2-5 нуклеотидів, широко розповсюджені по геному і охоплюючі усі хромосоми. Мінливість пов'язана з різною кількістю повторюваних елементів у різних генотипах. Система SSR-маркерів дає стабільно відтворювані в різних лабораторіях результати. Для цієї системи можлива стандартизація не тільки умов виконання, а і набору маркерів. Використання SSR 15-20 локусів дає можливість унікально диференціювати сорти ячменю, пшениці, кукурудзи, сої та інших

культур [10, 11, 12]. Практика показує, що при належній кількості маркерів усі існуючі сорти можна диференціювати і визначати генетичні дистанції між ними.

Критерій однорідності теж визначається цією системою маркерів. Якщо сорт складається з декількох генотипів або комбінації генотипів, то кожен з них може різнитися за алельним станом.

За допомогою SSRP-аналізу можливе створення молекулярно-генетичного паспорта генотипу. Останній засвідчує відмінні особливості профілю ДНК, що належить даному сорту, лінії, гібриду. Профіль ДНК - специфічний розподіл фрагментів ДНК-продуктів ампліфікації в електрофорезному гелі. Молекулярно-генетичний паспорт відбиває особливості структури ДНК сорту, лінії, гібрида, який дає змогу унікально його ідентифікувати. Паспортизація генотипів здійснюється за формулами, у яких відображена характеристика варіабельних локусів. Локус визначається (кодується) буквою латинського алфавіту, у нижньому індексі наводиться молекулярна маса алеля. Однією із задач паспортизації є встановлення рівня генетичної мінливості і гетерогенності сорту. У випадку сорту-популяції необхідно встановити кількість біотипів, що входять до складу сорту, і відповідно до цього підрахувати кількість необхідних для аналізу рослин, що репрезентують усю популяцію (приблизно 100 рослин). При аналізі лінійного сорту встановлюється генетична одноманітність за декількома локусами у 20 індивідуальних рослин. DUS-тест не реєструє гібриди. Система мікросателітних маркерів спроможна до фіксації генотипу гібрида.

Для здійснення контролю за сортами, занесеними до Реєстру сортів, необхідно створення банку даних за профілями ДНК по кожній культурі. При надходженні заявки про реєстрацію нового сорту в Держсортслужбу з охорони прав на сорти рослин, репрезентативна частка насіння повинна аналізуватись за профілем ДНК для встановлення генетичної формули і паспортизації. Порівняння генетичної формули з існуючими в банку даними встановлюватиме ступінь новизни сорту, що пропонується. За основу потрібно брати досягнення судово-медичної генетики при встановленні особи людини [13]. У розвинених країнах створені банки генетичних даних людей ризикових професій - військових, поліцейських, пожежників тощо. При необхідності встановити особу потерпілого профіль ДНК- залишків порівнюється з банком даних. Практика показала, що для унікальної ідентифікації досить 12-15 локусів. У локусах міститься інформація про хромосомну локалізацію і алельний стан.

У Південному біотехнологічному центрі у рослинництві (ПБЦ) розроблені принципи і створена методологія використання ПЛР- аналізу для ідентифікації і реєстрації генотипів сільськогосподарсь

ких рослин [14, 15, 16]. Поповнюється база молекулярно-генетичних даних генотипів сортів, ліній, гібридів таких важливих культур, як пшениця, ячмінь, кукурудза, соняшник.

Система використання молекулярних маркерів на основі SSRP- аналізу за критеріями визначення відмінності, одноманітності, стабільності відповідає DUS-тесту UPOV. Обґрунтування відповідності DUS-критеріям заявленого сорту при тестуванні за допомогою SSR- маркерів такі:

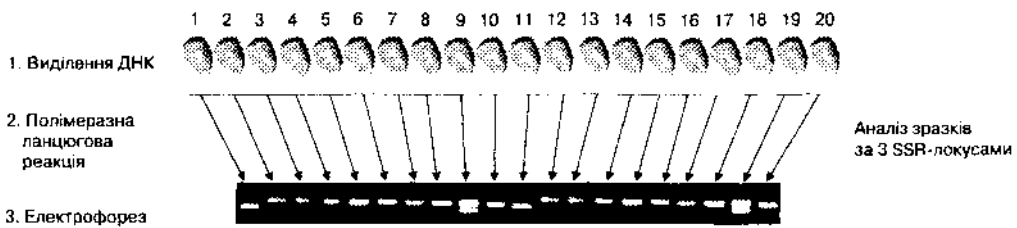
- *критерій відмінності.* Аналіз належної кількості (потенційно необмеженої) мікросателітних локусів дасть можливість тестувати заявлений сорт на відмінність від усіх існуючих загальновідомих сортів і визначити генетичні дистанції між ними;
- *критерій однорідності.* Генетично однорідні гомозиготні лінії повинні мати однаковий ДНК-спектр за кожним мікросателітним локусом. Успадкування алелів певного локусу здійснюється за законами Менделя, тобто за кожним локусом гібрид F1 повинен отримати один алель від материнської, другий - від батьківської лінії. ДНК-спектри гібрида F1 мають бути ідентичними та поєднувати алелі вихідних форм;
- *критерій стабільності.* Насіння певного сорту різних років і репродукцій мусить мати стабільні та ідентичні ДНК-спектри мікросателітних локусів. Ми пропонуємо реєстрацію сортів за SSR-аналізом як додаткову до DUS-тесту, але впевнені, що при поширенні ДНК-ої системи реєстрації генотипів необхідність в DUS-тесті просто відпаде.

На рисунку зображена схема реєстрації генотипів на прикладі аналізу зразків кукурудзи.

За генетичними формулами можна ідентифікувати будь-який генотип. У банку даних зберігаються дані про зареєстровані сорти, лінії і гібриди, при надходженні партії насіння-кандидата в сорти, проводиться типування ДНК, формула вводиться в комп'ютер для порівняння з існуючими. За допомогою ДНК-профілювання виключається можливість повторної реєстрації сорту або гібрида. У той же час, порівняння даних за декілька років дасть можливість зробити висновки про зміни в алельному стані, що відбулись у процесі селекції. Поява нових алелів, розширення генетичної бази за рахунок віддаленої гібридизації і генної інженерії мають контролюватись за допомогою молекулярних маркерів.

Створення молекулярно-генетичного паспорта полегшує задачу охорони прав на сорт. При виникненні суперечливих питань вони можуть бути вирішені за короткий строк шляхом типування ДНК, запису формули генотипу і порівняння його зі стандартом сорту. Таким чином, досягнення молекулярної генетики, яка нещодавно

I. Визначення генетичної чистоти зразків кукурудзи



II. Відбраковування нетипового насіння (зразки 1, 9, 11, 19) та відбір типових зразків (зразки 2-8, 10, 12-18, 20)

III. Генотипування одного зі зразків за 15-17 локусами



Рис. Схема реєстрації генотипів кукурудзи

була лише теоретичною наукою, знайшли широке впровадження в селекції рослин і охороні прав на сорти рослин.

Використана література:

1. Серебровский А.С. Генетический анализ. - М.: Наука, 1970. - 342 с.
2. Smith J., Smith O. The use of morphological, biochemical and genetic characteristics to measure distance and to test for minimum distance between inbred lines of maize (*Zea mays* L)//UPOV Document. - 1989. - 18 p.
3. Сиволап Ю.М. Геном растений и его улучшение. К.: Урожай, 1994. - 192 с.
4. Конарев В.Г. Белковые маркеры в сортовой идентификации и регистрации генетических ресурсов культурных растений // Сб. науч. тр. по приклад, ботанике, генетике и селекции. - Л., 1987.- Т. 114. - С. 3-14.
5. Созинов А.А. Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. - М.: Наука, 1985.- 272 с.
6. Smith J. Genetic variability within U.S. hybrid maize: multivariate analysis of isozyme data//Crop Sci. 1984. Vol. 24., P. 1041-1046.
7. Писарева Л.А., Губарева Н.К., Комаров В.И. О возможности использования показателя седиментации и электрофореза глиаина в селекционном улучшении качества зерна пшеницы сорта Ленинградка // Тр. по приклад, ботанике, генетике и селекции. - Л., 1984.-Т. 85.- С. 83-91.
8. Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Э, Асыка Ю.А. Исследование генетических взаимоотношений у линий кукурузы при помощи RAPD и зеинов // Цитология и генетика. - 1997. - Т.31, № 1. - С. 16-20.
9. Лобов В.П., Даскалюк А.П., Скрипка Л.В., Тищенко Е.Н. Организация нуклеотидных последовательностей ДНК растений. - К.: Наук, думка, 1986. - 140 с.
10. Сиволап Ю.М., Чеботарь С.В., Топчиева Е.А., Корзун В.Н., Тоцкий В.Н. Исследование молекулярно-генетического полиморфизма сортов *Triticum aestivum* L. с помощью RAPD и SSRP-анализа // Генетика. - 1999. - № 12. - С. 1665- 1673.
11. Сиволап Ю.М., Брик А.Ф., Сичкарь В.И. Исследование молекулярно-генетического полиморфизма сои (*Glycine max* L.) с помощью ПЦР-анализа // Цитология и генетика. - 1998. - Т.32, № 4. - С. 89-96.
12. Вербицкая Т.Г, Кожухова Н.Э, Гужва Д.В, Сиволап Ю.М, Соколов В.М Дифференциация линий кукурузы при помощи молекулярных маркеров // Кукуруза и сорго. - 1997. - № 6. - С. 7-11.
13. Кожухова Н.Е., Кривда Г.Ф., Кривда Р.Г., Сиволап Ю.М., Суліма Ю.Ю., Чеботар С.В. Використання аналізу ДНК у судово-медичних експертизах / За ред. Ю.М.Сиволапа та Г.Ф.Кривди. - О.: Одес. держ.

мед. ун-т. - 2001. - 92 с.

14. Сиволап Ю.М., Требельский Д.Ю. Дифференциация и идентификация генотипов кукурузы // Цитология и генетика. - 2001 Т. 35, №3. - С. 14-21.

15. Сиволап Ю.М., Чеботарь С.В. Дифференциация, идентификация и создание базы данных сортов *T. aestivum* L. украинской селекции на основе STMS-анализа // Цитология и генетика. - 2001, - Т.35, №6. - С. 18-27.

16. Сиволап Ю.М., Бальвинская М.С., Родер М. SSRP - анализ молекулярно-генетического полиморфизма сортов ярового ячменя Южно-украинской селекции // Докл. РАСХН - 2001. - № 5. - С. 3-7.

УДК 631.527:577.213/.217:573.6:347.779.1

Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Е. ДНК-технології в реєстрації й охороні прав на сорти рослин//Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. - 2005. - № 1, - С. 66-74.

Проаналізовано сучасний стан впровадження ДНК-маркерів у світову практику селекції рослин. Представлено результати науково-дослідної діяльності Південного біотехнологічного центру у рослинництві (м. Одеса), спрямованої на розробку ДНК-технологій диференціації, ідентифікації та реєстрації важливих сільськогосподарських культур.

Ключові слова. Генетика і селекція рослин, молекулярні маркери, ДНК-профілювання, ПЛР-аналіз, реєстрація сортів.

УДК 631.527:577.213/.217:573.6:347.779.1

Сиволап Ю.М., Кожухова Н.Е. ДНК- технологии в регистрации и охране прав на сорта растений //Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. - 2005. - № 1. - С. 66-74.

Проанализировано современное состояние внедрения ДНК- маркеров в мировую практику селекции растений. Представлены результаты научно-исследовательской деятельности Южного биотехнологического центра в растениеводстве (г. Одесса), направленные на разработку ДНК-технологий дифференциации, идентификации и регистрации важных сельскохозяйственных культур.

УДК 631.527:577.213/.217:573.6:347.779.1

Sivolap Y., Kozhukhova N. DNA Techniques in the register and protection of plant varieties rights // Сортовивчення та охорона прав на сорти рослин. - 2005. - № 1. - С. 66-74.

Modern state of DNA-markers introduction in world plant breeding practice was analyzed. Results of South plant biotechnology center research activity (Odessa), directed on DNA-technologies development for differentiation, identification and registration of important agricultural crops were given.