

Marcin Matuszczak

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Poznaniu

Ochrona praw hodowców odmian rzepaku – koncepcja odmiany w istocie pochodnej (EDV)

Protection of oilseed rape breeder's rights – the concept of Essentially Derived Variety (EDV)

Słowa kluczowe: rzepak, EDV, markery molekularne

Odmiany rzepaku podlegają ochronie zgodnie z polskimi i unijnymi regulacjami o ochronie prawnej odmian roślin oraz na podstawie Aktu z 1991 r. Konwencji UPOV (Międzynarodowa Konwencja Ochrony Nowych Odmian Roślin). Obecnie, dzięki nowym technikom hodowlanym, na bazie istniejących odmian chronionych powstają nowe odmiany pochodne, nieznacznie tylko różniące się od odmian macierzystych. Obowiązujące prawo przewiduje ochronę hodowców odmian macierzystych poprzez wprowadzenie koncepcji odmiany w istocie pochodnej (EDV). Prace nad praktycznym zastosowaniem tej koncepcji prowadzone są dla różnych gatunków roślin. Kilka lat temu powstała międzynarodowa grupa robocza, której celem jest opracowanie zasad ustalania statusu EDV dla odmian rzepaku.

Key words: oilseed rape, EDV, molecular markers

Oilseed rape varieties are protected according to the rules of national and EU law as well as the UPOV Convention 1991 Act. The present possibilities of modern biotechnology techniques make it possible to develop new varieties that derive predominantly from existing initial variety. The rules, which use the concept of Essentially Derived Variety (EDV), are established to protect the breeder of an initial variety. Currently, the studies on essential derivation in many crop species are conducted. A few years ago such studies, dedicated specially for rapeseed varieties, were also started by an international working group.

Wstęp

Prawa hodowców odmian roślin uprawnych podlegają ochronie — zgodnie z prawem krajowym, jak i międzynarodowym. Zasady tej ochrony znajdują się w obowiązującej od 1 maja 2004 r. ustawie o ochronie prawnej odmian roślin (Dz. U. z 2003 r. Nr 137, poz. 1300), a także w ustawie unijnej (Rozporządzenie Rady (WE) Nr 2100/94 z dnia 27 lipca 1994 r. w sprawie wspólnotowego systemu ochrony odmian) (Dz. U. Wspólnot Europejskich L 227 z dnia 1.09.1994 r. str. 1). Ustawy te są zgodne z prawem międzynarodowym, a w szczególności z Aktem z 1991 r. Konwencji UPOV (Międzynarodowa Konwencja Ochrony Nowych Odmian

Roślin). Polska jest krajem członkowskim UPOV od 11 listopada 1989 r., a w dniu 15 sierpnia 2003 r. ratyfikowała Akt z 1991 r.

Rzepak jest istotną z gospodarczego punktu widzenia rośliną uprawną. Każdego roku zarówno w Polsce jak i poza granicami naszego kraju powstają jej nowe, ulepszone odmiany. Obecnie w Polsce zarejestrowane są 42 odmiany rzepaku ozimego oraz 15 odmian rzepaku jarego (stan na 2004 rok wg danych COBORU). Uzyskanie wielu odmian wymagało prowadzenia długoletnich prac hodowlanych. W wyniku tych prac stworzono genotypy, które charakteryzują się m.in. dobrą plennością, odpornością na choroby i szkodniki oraz ulepszonymi cechami jakościowymi. Dorobek ten powinien podlegać ochronie prawnej. Obecnie pojawiły się jednak metody pozwalające w szybki sposób uzyskać rośliny o zmienionych cechach. Takie zmodyfikowane formy można łatwo zarejestrować jako nowe odmiany, korzystając z istniejących zasad rejestracji odmian. Jeśli do tworzenia tego rodzaju odmian były wykorzystywane odmiany już wcześniej zarejestrowane, to istnieje niebezpieczeństwo, że prawa hodowców odmiany macierzystej, stanowiącej tło genetyczne dla nowej odmiany, nie będą chronione. Pomimo tego, że podmiot zgłaszający nową odmianę dokonał jedynie modyfikacji pojedynczej cechy, po zarejestrowaniu odmiany korzysta on z pełnej ochrony przysługującej właścicielowi odmiany, natomiast twórca tła genetycznego w praktyce nie może dochodzić swoich praw do tego materiału. W związku z tym wśród hodowców pojawiła się koncepcja pozwalająca zapewnić ochronę praw twórców odmian macierzystych. Jest to koncepcja odmiany w istocie pochodnej (*Essentially Derived Variety, EDV*). Definicja EDV zawarta została po raz pierwszy w Akcie z 1991 r. Konwencji UPOV (art. 14, ust. 5). Obecnie obowiązujące polskie prawodawstwo także zawiera podobną definicję (art. 22, ust. 1, pkt. 3 oraz art. 22, ust. 2 ustawy o ochronie prawnej odmian roślin). Prace nad praktycznym zastosowaniem tej koncepcji są prowadzone dla różnych gatunków roślin. Kilka lat temu powstała międzynarodowa grupa robocza, której celem jest opracowanie zasad ustalania statusu EDV dla odmian rzepaku.

Definicja odmiany w istocie pochodnej (EDV)

Zgodnie z Aktem z 1991 r. Konwencji UPOV (art. 14, ust. 5) „odmianę uważa się za w istocie pochodną innej odmiany (odmiana macierzysta), gdy:

- jest pochodną głównie z odmiany macierzystej lub z odmiany, która sama jest pochodną głównie z odmiany macierzystej, zachowując przejaw zasadniczych właściwości, które wynikają z genotypu lub kombinacji genotypów odmiany macierzystej,
- wyróżnia się wyraźnie od odmiany macierzystej,

- pomijając różnice wynikające ze sposobu wyhodowania, odpowiada odmianie macierzystej w przejawie zasadniczych właściwości, które wynikają z genotypu lub kombinacji genotypów odmiany macierzystej.

Odmiany w istocie pochodne mogą być otrzymywane na przykład poprzez selekcję mutantu naturalnego lub sztucznego albo wariantu somaklonalnego, selekcję pojedynka odróżniającego się od roślin odmiany macierzystej, krzyżowanie wsteczne lub przy pomocy inżynierii genetycznej.”

Podobnie brzmi definicja zapisana w ustawie o ochronie prawnej odmian roślin (art. 22, ust. 1, pkt. 3 oraz art. 22, ust. 2). Zgodnie z tą definicją „odmianę uznaje się za pochodną od odmiany macierzystej, jeżeli jest ona odrębna od odmiany macierzystej oraz jeżeli:

- pochodzi z odmiany macierzystej lub z innej odmiany pochodnej od tej samej odmiany macierzystej i zachowuje właściwości wynikające z genotypu lub kombinacji genotypów odmiany macierzystej,
- jej właściwości są zgodne z istotnymi właściwościami odmiany macierzystej wynikającymi z jej genotypu bądź kombinacji genotypów, z wyjątkiem różnic, które wynikają ze stosowania metod hodowlanych polegających na:
 - selekcji naturalnych bądź indukowanych mutantów,
 - selekcji nowych form w odmianach macierzystych,
 - stosowaniu krzyżowań wstecznych,
 - inżynierii genetycznej.”

Konsekwencje wprowadzenia pojęcia odmiany w istocie pochodnej (EDV)

Wprowadzenie pojęcia odmiany w istocie pochodnej (EDV) umożliwia zabezpieczenie praw hodowców istniejących już odmian tworzonych za pomocą klasycznych metod (odmiany macierzyste). W ten sposób — poprzez tworzenie i wspieranie systemu dla skutecznej ochrony własności intelektualnej — powstaje mechanizm finansowania dalszego rozwoju klasycznej hodowli roślin. Rozwój ten jest istotny dla promowania większej bioróżnorodności w hodowli i rolnictwie oraz dla zapobiegania degeneracji źródeł zmienności genetycznej. W przyszłości będzie możliwa także integracja klasycznej hodowli oraz hodowli opartej na metodach biotechnologicznych.

Konwencja UPOV dość ogólnikowo opisuje pojęcie odmiany w istocie pochodnej. Pojawiają się więc interpretacje i podsumowania, które mają ułatwić zastosowanie tej koncepcji w praktyce oraz wyznaczyć konkretne sposoby postępowania. Tego rodzaju dokument powstał w ramach ISF (*International Seed Federation*, Międzynarodowy Związek ds. Nasiennictwa). Treścią dokumentu jest stanowisko ISF na temat własności intelektualnej (ISF 2003), które pozwala także bliżej określić konsekwencje wprowadzenia pojęcia odmiany w istocie pochodnej (EDV).

Pojęcie odmiany EDV wprowadza zależność między odmianami, z korzyścią dla odmiany chronionej. Odmiana macierzysta musi być odmianą chronioną. Zależność może istnieć jedynie od pojedynczej odmiany macierzystej. Zależna odmiana może być wyprowadzona bezpośrednio z odmiany macierzystej lub z odmiany, która sama już jest odmianą zależną. Zależność może, ale nie musi wynikać z faktu „istotnego pochodzenia” — zależność jest prawnym skutkiem wytworzenia odmiany w istocie pochodnej (EDV) z odmiany chronionej.

Przykłady metod hodowlanych, które mogą doprowadzić do powstania odmian w istocie pochodnych (EDV) są określone w cytowanych wcześniej definicjach i obejmują wiele nowoczesnych metod. To ważny sygnał dla hodowców, którzy stosują indukowaną lub naturalną mutagenezę, selekcję wariantów somaklonalnych, selekcję indywidualnych wariantów odmiany macierzystej, wielokrotne krzyżowanie wsteczne czy transformację. Ich nowe odmiany mogą zostać potraktowane jako odmiany w istocie pochodne (EDV). Należy jednak pamiętać, że odmiana EDV musi być w przeważającym stopniu wyprowadzona z określonej odmiany chronionej — jeśli odmiana zostanie wytworzona bez użycia odmiany chronionej, to nie może być mowy o „istotnym pochodzeniu”. Poza tym pojęcie to odnosi się tylko do odmiany pochodnej, która zawiera niemal cały genotyp pojedynczej odmiany macierzystej. Można powiedzieć, że „istotne pochodzenie” to efekt zarówno metody hodowlanej, celu hodowlanego, jak i osiągniętego rezultatu.

Status EDV określa się raczej na podstawie genotypu niż fenotypu. Nie można polegać na cechach morfologicznych ze względu na wpływy środowiska oraz brak określenia genetycznego podłoża większości tych cech. Kluczem dla określenia statusu EDV jest ilość genotypu przeniesiona do nowej odmiany, mierzona wartością podobieństwa lub dystansu genetycznego między odmianami. Niezbędne jest określenie wiarygodnych sposobów oceny dystansu genetycznego — można wykorzystać do tego celu markery molekularne. Wartość podobieństwa może różnić się dla różnych gatunków.

Konwencja UPOV nie określa, jakie techniki powinny zostać użyte do porównywania odmian oraz jaka wartość graniczna podobieństwa determinuje uznanie danej odmiany za EDV. Ustalanie oraz korzystanie ze statusu EDV nie jest także obowiązkiem instytucji zajmujących się rejestracją odmian. Sprawy te pozostają w gestii hodowców. Określenie metod oraz oszacowanie wartości granicznych podobieństwa dla ustalania statusu EDV powinno zostać wykonane osobno dla każdego gatunku. Zadanie to powinno zostać powierzone ekspertom — hodowcom zajmującym się danym gatunkiem oraz posiadającym wiedzę na temat potrzebnych metod.

Status odmiany w istocie pochodnej (EDV) jest ustalany na zawsze. Nawet, jeśli odmiana macierzysta przestanie istnieć, odmiana pochodząca od niej — poprzez cały łańcuch EDV — pozostanie traktowana jako EDV zależna od odmiany macierzystej, tak jak i wszystkie pozostałe EDV w łańcuchu. Zasada ta jest stworzona by chronić hodowcę odmiany macierzystej, a nie hodowców odmian pochodnych.

Ustalanie statusu EDV – rola markerów molekularnych

Aby ustalić status EDV niezbędne są wstępne ustalenia dokonywane w gronie hodowców danego gatunku. Należy określić rodzaj strategii hodowlanych, dla których jest wymagana zależność. Na tej podstawie można ustalić odpowiedni poziom pokrewieństwa, dla którego odmiana mogłaby zostać uznana za zależną. Jednocześnie trzeba rozważyć, jaki jest wpływ konkretnych wartości granicznych podobieństwa na swobodę dostępu do materiałów wyjściowych, promowanie bioróżnorodności w hodowli oraz dostępność nowych źródeł zmienności na przyszłość. Te parametry decydują o tym, czy ustalone zasady mają pozytywny wpływ na dalszy rozwój hodowli danego gatunku.

Równoległe z określaniem wartości granicznych podobieństwa, należy dokładnie określić metodę używaną do oznaczania tego podobieństwa. Narzędziem dla ustalania podobieństwa między odmianami są markery molekularne (metody oparte na analizie DNA). Mają one liczne zalety, które stanowią o ich przydatności w ustalaniu statusu EDV (Smith 1996):

- pozwalają rozróżnić większość odmian dla wielu gatunków roślin — nawet odmiany bardzo blisko spokrewnione;
- są niezależne od wpływów środowiska;
- ich zastosowanie wymaga mniej czasu niż ocena podobieństwa na podstawie cech fenotypowych;
- często dostarczają jednocześnie danych o specyficznych allelach w zmapowanych loci;
- mogą być rutynowo analizowane, a uzyskane dane można gromadzić w bazach danych pozwalających na porównywanie wielu odmian;
- pozwalają na weryfikację pochodzenia odmiany.

Markery molekularne stosowane są zarówno przy wstępnych badaniach zmienności wewnątrz i międzyodmianowej, podczas określania wartości granicznych podobieństwa, jak i później, dla ustalania stopnia podobieństwa oraz statusu EDV konkretnych odmian.

Przy wyborze konkretnej metody pozyskiwania markerów dla oceny podobieństwa i ustalania statusu EDV trzeba wziąć pod uwagę wiele czynników specyficznych dla danego gatunku rośliny. Istotny jest stan dostępności markerów, ich możliwości w odróżnianiu odmian, użyteczność dla pomiaru dystansu genetycznego oraz dla weryfikacji pochodzenia odmian. Parametry te różnią się w zależności od stosowanych markerów, badanego gatunku oraz stopnia zaawansowania badań. Dla danego gatunku powinny zostać ustalone maksymalnie dwie metody odpowiednie dla ustalania statusu EDV. Przy wyborze metody można kierować się następującymi wskazówkami (Smith 1996):

- metoda powszechnie dostępna i używana rutynowo w wielu laboratoriach;

- wysoka zdolność odróżniania odmian — nawet dla odmian podobnych w 95% (określona na podstawie danych o pochodzeniu);
- brak interakcji ze środowiskiem;
- zbadane dziedziczenie i lokalizacja na chromosomach;
- 30 do 100 loci rozmieszczonych równomiernie w całym genomie — pozwala to na uzyskanie wartości błędu standardowego dystansu genetycznego poniżej 5%;
- wysoka powtarzalność;
- standaryzacja metod uzyskiwania profili prążków;
- standaryzacja metod odczytu i gromadzenia danych;
- stosunkowo niski koszt;
- metoda pozwalająca na wykonanie analiz w krótkim czasie (poniżej 3 miesięcy dla 10–100 odmian).

Przykład rajgrasu

Dla rajgrasu proces tworzenia zasad obowiązujących przy ustalaniu statusu EDV został już zakończony. W 2002 r. w Chicago na podstawie wcześniejszych badań oraz prac specjalnej grupy roboczej przyjęto zasady kodeksu postępowania dla odmian w istocie pochodnych (EDV) rajgrasu (rys. 1).

Opracowane zasady określają rodzaj używanych markerów molekularnych oraz liczbę i wielkość granicznych wartości podobieństwa. Ocena podobieństwa jest oparta o analizę markerów AFLP. Wykorzystano dane uzyskane za pomocą pięciu par starterów. Badając odmiany stosowano próby złożone z 60 roślin. W czasie badań sprawdzano też przydatność cech fenotypowych. Ostatecznie zdecydowano się na model oceny statusu EDV z pojedynczą wartością graniczną podobieństwa równą 93% (dystans 7%) (tab. 1).

Tabela 1

Wartość graniczna podobieństwa przy ustalaniu statusu EDV dla rajgrasu

The similarity threshold for assessing putative essential derivation of perennial ryegrass

	Brak statusu EDV odmiany <i>No essential derivation</i>	Dyskusja nad statusem odmiany <i>Discussion about EDV status</i>
0%	< Podobieństwo — <i>Similarity</i> >	93% 100%

Jeśli dwie odmiany wykazują podobieństwo niższe niż 93%, to brak jest „istotnego pochodzenia”. Jeśli podobieństwo jest wyższe, to wynik analizy stanowi podstawę powołania arbitrażu ze strony ISF. Arbitr ma prawo zażądać od hodowcy domniemanej odmiany pochodnej dowodu, że odmiana ta nie jest odmianą pochodną od domniemanej odmiany macierzystej. Wcześniej — zanim ustalono wartość graniczną — ciężar udowodnienia faktu istnienia „istotnego pochodze-



**Principles of a Code of Conduct in
Essentially Derived Varieties of Perennial Ryegrass**

(Adopted in Chicago, May 2002)

1. The 1991 Act of the UPOV Convention entered into force in 1998 and introduced the concepts of essential derivation and dependency from an initial variety (i.v.).
2. The Forage Plants Section of ASSINSEL conducted in 1997 and 1998 a model study to evaluate tools and to determine possible thresholds for assessing putative essential derivation.
3. Based on the results of the study, the Section proposed during its meeting in Melle in January 1999 to adopt a provisional threshold, 7 for the squared Euclidean distance between pairs, using 60 plants per variety and a 5 primer combination. (The testing protocol, as annexed to this present code of conduct, should be followed precisely for assessing the distance). That proposal was confirmed by the section during its meeting in Melle in March 2002 and the following principles for a Code of Conduct were agreed upon.
4. In case of doubt a new variety is essentially derived from an i.v., doubt based on the fact that the new variety presents the essential characteristics of that i.v., the breeder of the i.v. will have, very likely, the squared Euclidean distance between the two varieties measured.

If the distance is 7 or lower, the breeder of the i.v. may ask for ISF arbitration and the arbitrator may ask for the reversal of the burden of proof. The breeder of the putative essential derived variety (e.d.v.) will have to show that he has not practiced essential derivation from the i.v.. The arbitrators also have the right to ensure that the putative i.v. is not itself an e.d.v. from a preexisting variety.
5. The Code of Conduct would only apply to varieties commercialized or registered for the first time after its entry into force.
6. In order to encourage companies to adopt the code of conduct so that it could be possible to refine the threshold based on new molecular data, a transitional period of 5 years will be established after the entry into force of the code of conduct. During the transitional period the companies adhering to the code shall commit themselves:
 - Not to claim any dependency rights for essentially derived varieties commercialized or registered for the first time during the first two years after adoption of the code of conduct.
 - To agree on compulsory licensing of the e.d.v. by the owner of the i.v. at a level of 50% of royalties obtained in normal commercial practices for essentially derived varieties commercialized or registered for the first time during the following 3 years.
7. After the period of 5 years the threshold will be reviewed and, if necessary revised. Then the code will continue to apply and the owner of the i.v. will have the freedom to exercise his full rights as provided for in the applicable laws.

Rys. 1. Zasady kodeksu postępowania dla odmian w istocie pochodnych (EDV) rajgrasu — *Principles of a Code of Conduct in Essentially Derived Varieties of Perennial Ryegrass*

nia” leżał po stronie hodowcy odmiany macierzystej, co w praktyce uniemożliwiało egzekwowanie jakiegokolwiek z przysługujących mu praw. Obecnie to hodowca nowej odmiany musi udowodnić, że powstała ona w sposób, który nie budzi wątpliwości, jeśli chodzi o pochodzenie materiału oraz stosowane metody hodowlane. Ustalone zasady obowiązują w obecnym kształcie w ramach pięcioletniego okresu przejściowego. Pozwoli to na sprawdzenie w praktyce całego systemu oraz umożliwi wprowadzenie ewentualnych modyfikacji wartości granicznych podobieństwa po pięciu latach funkcjonowania nowych zasad.

Przebieg prac nad tworzeniem zasad ustalania statusu EDV dla odmian rzepaku

Grupa robocza ISF dla oceny statusu EDV odmian rzepaku powstała 7 marca 2001 r. Przewodniczącym grupy jest Gisbert Kley (DSV), zaś przedstawicielem z ramienia ISF Bernard Le Buanec. W grupie roboczej reprezentowanych jest wiele międzynarodowych firm hodowlanych oraz firm i instytucji badawczych związanych z hodowlą rzepaku, m.in.: DSV, Aventis, Monsanto, KWS, Pioneer, IHAR – Poznań, Syngenta, Advanta Seeds, Limagrain, University of Hohenheim, TraitGenetics GmbH.

Na pierwszym etapie prac należy określić dostępne techniki molekularne oraz metody statystyczne odpowiednie dla obliczenia wartości podobieństwa rzepaku. Trzeba też ustalić, jakie typy odmian występują dla rzepaku. Następnie, przy użyciu wybranych technik molekularnych analizowana jest zmienność wewnątrzodmianowa dla różnych typów odmian. Wstępnie określa się też wielkość próbek dla tego rodzaju analiz. Na kolejnym etapie można już rozpocząć charakterystykę zróżnicowania między odmianami rzepaku, które istnieją na rynku. Uzyskane wyniki pozwolą na weryfikację wielkości próbek stosowanych w analizach oraz posłużą do ustalania wielkości granicznych podobieństwa potrzebnych dla oceny statusu EDV.

Obecnie dla rzepaku dostępne są następujące rodzaje markerów: RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Figdore i in. 1988, Song i in. 1988), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Welsh i McClelland 1990, Williams i in. 1990, Uzunova i in. 1995, Foisset i in. 1996), SSR (*Simple Sequence Repeats*) (Lagercrantz i in. 1993, Kresovich i in. 1995; Szewc-McFadden i in. 1996, BrassicaDB), ISSR (*Inter Microsatellite Amplification*) (Charters i in. 1996), STMS (*Sequence Tagged Microsatellite Site*) (na podstawie genomu *Arabidopsis thaliana*) (Barret i in. 1995), ACGM (*Amplified Consensus Genetic Markers*) (na podstawie genomu *Arabidopsis thaliana*) (Brunel i in. 1999), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Vos i in. 1995, Lombard i in. 2000). W trakcie dyskusji nad wyborem odpowiedniej metody porównywano głównie dwie z nich: AFLP oraz SSR.

Pierwsza metoda pozwala uzyskać dużą ilość danych w pojedynczej analizie, przez co koszt analiz jest niski. Wadą tej metody jest jednak to, że jest ona chroniona patentem, przez co nie jest dostępna dla zastosowań komercyjnych. Oprócz tego istnieją różnice w metodyce uzyskiwania tych markerów w różnych laboratoriach, trudno więc uzyskiwać porównywalne wyniki. Brak także wystarczającej ilości danych o dziedziczeniu i lokalizacji chromosomowej markerów AFLP, co nie pozwala na wybór markerów, które reprezentowałyby cały genom rzepaku.

Metoda SSR jest bardziej kosztowna. Do niedawna dla rzepaku istniało też niewiele dostępnych markerów tego typu. Obecnie jednak w różnych bazach danych na świecie pojawia się coraz więcej markerów SSR dla rzepaku (BrassicaDB). Dostępne są także informacje o lokalizacji chromosomowej tych markerów. Wiadomo, że loci SSR są równo rozmieszczone w całym genomie rzepaku, co jest bardzo istotne przy ocenie podobieństwa. Ważną zaletą jest też to, że metodyka analiz dla markerów SSR pozwala na wymianę informacji między różnymi laboratoriami.

Po burzliwej dyskusji grupa robocza zdecydowała o wyborze metody SSR jako najlepszej dla określania statusu EDV odmian rzepaku. Przeprowadzenie analiz powierzono firmie TraitGenetics z Niemiec, która dysponuje dużą ilością zmapowanych markerów SSR rzepaku (około 300 markerów). Markery te nie są publicznie dostępne, jednak dla celów oceny statusu EDV odmian mogą być udostępniane przez firmę TraitGenetics po wniesieniu odpowiedniej opłaty (80 €/marker).

Do ustalania podobieństwa na podstawie markerów molekularnych używane są różne metody statystyczne (Gower 1985, Jackson i in. 1989). Podobieństwo określa się m.in. za pomocą takich współczynników jak: Jaccard (1908), Dice (1945) / Nei i Li (1979), MDR (*Modified Rogers' Distance*) (Rogers 1972) oraz Sokal i Michener (1958). Aby status EDV był ustalany jednoznacznie trzeba określić konkretny współczynnik podobieństwa, który będzie używany do tego celu w przyszłości. Najczęściej używanym w dotychczasowych badaniach jest współczynnik Dice / Nei i Li.

Ważnym etapem prac jest określenie typów odmian, które istnieją na rynku. Różne typy odmian charakteryzują się odmiennym stopniem zmienności wewnątrz odmiany oraz pomiędzy odmianami. Należy zbadać te parametry w odniesieniu do każdego typu, aby zdecydować czy można ustalać status EDV według wspólnego modelu. Jeśli różnice są zbyt wielkie można rozważyć określenie osobnego modelu dla każdego typu odmiany. Dla rzepaku rozróżniono następujące typy odmian:

- SOSR, typ kanadyjski, odmiany jare;
- WOSR, typ niemiecki/brytyjski, odmiany ozime, większe zróżnicowanie genotypów;

- WOSR, typ francuski, odmiany ozime, czyste linie, mniejsze zróżnicowanie genotypów;
- odmiany mieszańcowe.

W czasie pierwszego etapu badań prowadzonych przez grupę roboczą analizowano zmienność wewnątrzodmianową dla różnych typów odmian. W tym celu dokonano bardziej szczegółowego podziału i wyróżniono 5 grup odmian (dla każdej grupy wybrano 3 odmiany do badań):

- dihaploidy (Pollen, Mikado, Quantum);
- czyste linie (Bristol, Columbus, Drakkar);
- wąskie populacje (Lirajet, Westar, Legend);
- szerokie populacje (Excell, Navajo, Rainbow);
- syntetyczne (Carolla, Winner, Dexter).

Odmiany mieszańcowe potraktowano w sposób odmienny — kwestia statusu EDV dotyczy w tym wypadku jedynie form rodzicielskich, które można zakwalifikować do jednej z powyższych grup.

Dla wykonania badań hodowcy odmian z Australii, Kanady i Europy zgodzili się dostarczyć próbki 15 odmian, natomiast organizacje nasienne zainteresowanych państw zapewniły finansowanie badań:

- Kanada, Niemcy, Francja — po 24%;
- Wielka Brytania, Szwecja, Australia — po 10% (Australia wycofała się jednak z dalszego udziału w badaniach).

Badania zostały wykonane przez firmę TraitGenetics. Wybrano 80 markerów SSR o dobrej jakości, które stanowią jednocześnie reprezentację całego genomu rzepaku (ocena na podstawie mapy genetycznej). Za pomocą tych markerów badano próbki 15 odmian. Początkowo wykonano analizy 25 roślin/odmianę dla dihaploidów i czystych linii oraz 50 roślin/odmianę dla pozostałych grup. Analizowano przydatność konkretnych markerów oraz zmienność w obrębie każdej odmiany. Wykonano też analizy zmienności między odmianami stosując mieszaniny DNA z 5 roślin/odmianę. Okazało się, że nie jest możliwe odróżnienie zmienności wewnątrz odmiany od zróżnicowania pomiędzy różnymi odmianami. W kolejnym etapie analizowano wpływ wielkości próbki na wyniki analiz podobieństwa. Analizowano te same 15 odmian, lecz tym razem analizowano po 80 roślin/odmianę stosując mieszaniny DNA z 40 roślin/odmianę (2 próbki zbiorcze dla każdej odmiany). Uzyskane wyniki wskazują, że lepiej jest stosować próbki złożone z 40 roślin/odmianę niż z 5 roślin/odmianę. W przyszłości planowane są także badania stabilności odmiany w różnych latach. Do tych badań przeznaczono 5 odmian: Winner, Pollen, Bristol lub Columbus, Express oraz jedną z odmian kanadyjskich.

Po przeanalizowaniu uzyskanych dotąd danych zdecydowano, że badania nad EDV powinny dotyczyć czystych linii oraz populacji. Obecnie prowadzony jest końcowy etap badań, a więc analiza zmienności między odmianami obecnymi na

rynku. Trzeba zbadać możliwie dużą liczbę odmian. Początkowo do tych badań planowano wykorzystanie 5–10 odmian z Australii, 15–20 odmian z Kanady oraz 25–30 odmian europejskich. Ostatecznie zdecydowano się na 50 odmian ozimych oraz 50 odmian jarych (40 z Kanady i 10 z Australii). W przypadku czystych linii do badań zastosowano próbki złożone przynajmniej z 40 roślin/odmianę. Dla populacji ilość roślin na odmianę ustalano na podstawie wyników pierwszego etapu badań. Ponieważ firma TraitGenetics dodatkowo przeanalizowała dużą ilość odmian już w czasie pierwszego etapu badań, zdecydowano się skorzystać z tych wyników za dodatkową opłatą. Było to rozwiązanie tańsze niż zlecenie zupełnie nowych badań.

Kolejnym zadaniem jest określenie modelu granicznych wartości podobieństwa dla określania statusu EDV rzepaku oraz rodzaju metod hodowlanych, które prowadzą do powstania odmian w istocie pochodnych. W ten sposób definiuje się także „normalną praktykę hodowlaną”, która nie prowadzi do tworzenia odmian pochodnych. Grupa robocza skłania się raczej ku koncepcji wzorowanej na rajgrasie, w której istnieje pojedyncza wartość graniczna podobieństwa, powyżej której możliwa jest dyskusja nad statusem odmiany. Analizując wyniki dotychczasowych badań stwierdzono, że dla ustalenia wartości granicznej podobieństwa należy zastosować podejście statystyczne: 5% najbliższych spokrewnionych odmian może odpowiadać odmianom w istocie pochodnym (EDV). Po otrzymaniu wyników prowadzonych obecnie badań zmienności między odmianami zostanie dokonana analiza statystyczna w celu określenia, jakie wartości podobieństwa odpowiadają tym najbliższym spokrewnionym odmianom. Na tej podstawie zostanie ustalona graniczna wartość podobieństwa dla oceny statusu EDV rzepaku. Końcowym etapem prac grupy roboczej będzie opracowanie propozycji zasad kodeksu postępowania w przypadku odmian w istocie pochodnych (EDV) rzepaku — podobnie jak dokonano tego w przypadku rajgrasu.

Podsumowanie

Prace nad praktycznym wykorzystaniem koncepcji EDV dla odmian rzepaku są już mocno zaawansowane. Prawdopodobnie w 2005 roku dojdzie do ostatecznych rozstrzygnięć oraz do wejścia w życie kodeksu postępowania.

Niewątpliwie należy podkreślić znaczenie tego faktu dla ochrony praw hodowców istniejących obecnie odmian rzepaku. Niezwykle istotny jest też aspekt promowania tych zachowań hodowców, które sprzyjają utrzymaniu bioróżnorodności. Popierane są metody hodowlane, które mają na celu nie tylko polepszenie jakości uzyskiwanych odmian, ale także sukcesywne wprowadzanie nowego materiału do hodowli. Ogranicza się natomiast te metody, które w dalszej perspektywie mogłyby doprowadzić do znacznego zawężenia zmienności pomiędzy odmianami.

Warto zwrócić uwagę na istniejącą rywalizację między zwolennikami tradycyjnej hodowli a środowiskami związanymi z firmami biotechnologicznymi promującymi nowe technologie w hodowli. Niewątpliwie nowe prawo oraz jego aplikacje stanowią cios dla tych ostatnich. Dobrze się więc stało, że nowe regulacje promują jednocześnie integrację obu środowisk. Aby w nowych warunkach czerpać zyski z osiągnięć nowych technologii trzeba rozwijać zarówno te technologie, jak i tradycyjne metody hodowlane. Należy mieć nadzieję, że taka integracja nastąpi. Pozwoli to nam wszystkim, jako konsumentom, korzystać zarówno z zalet, jakie niosą nowe, ulepszone metodami biotechnologicznymi odmiany, jak też cieszyć się z utrzymującej się w otaczającym nas środowisku bioróżnorodności.

Dla polskich hodowców rzepaku nowa koncepcja i wynikające z niej ustalenia niosą zarówno korzyści, jak i zagrożenia. Jako uczestnicy światowej hodowli mamy świadomość, że pewne kierunki rozwoju są lepsze, a inne gorsze. Należy więc wspierać te inicjatywy i rozwiązania, które promują pozytywne trendy w hodowli. Istnieją jednak pewne uwarunkowania, specyficzne dla naszego rynku nasiennego oraz hodowli rzepaku w naszym kraju, które w zderzeniu z nowymi zasadami mogą nieść zagrożenia dla kondycji polskiej hodowli w przyszłości. Koncepcja odmian EDV stanowi rozszerzenie zakresu ochrony tych odmian, które są już chronione. Niestety w przypadku polskich odmian rzepaku istniejąca ochrona jest niedostateczna. Wynika to zarówno ze stosunkowo niewielkiej ilości zarejestrowanych polskich odmian, jak i z faktu, że nawet wśród odmian, które zostały zarejestrowane w COBORU zdarzają się takie, których twórcy nie posiadają wyłącznego prawa do ochrony. Dotyczy to zarówno nowszych odmian (np. składniki mieszańców złożonych Mazur, Kaszub, Lubusz i Pomorzanie), jak i starszych (np. odmiana Kana). Brak prawnej ochrony dla tych odmian może być zgubny w skutkach w sytuacji, gdy wprowadzona zostanie koncepcja odmian EDV. Hodowcy zagraniczni mogą bowiem próbować, w ramach konkurencyjnej walki, rościć sobie prawa do tych odmian. Wynika to ze specyfiki hodowli rzepaku w minionych latach. Materiały pochodzące z Polski stanowiły podstawę dla tworzenia wielu odmian zagranicznych. Możliwe jest więc istnienie dużego podobieństwa między naszymi odmianami a odmianami firm zachodnich. Niestety w toku badań prowadzonych przez grupę roboczą ISF dla oceny statusu EDV odmian rzepaku, polskie odmiany nie zostały wzięte pod uwagę. Stąd istnieje zagrożenie, że na podstawie wykazanego stopnia podobieństwa, hodowcy z zachodu będą próbowali domagać się uznania naszych materiałów za pochodne, jeśli nie będą to prawnie chronione odmiany. Tymczasem wszystkie zachodnie odmiany podwójnie ulepszone są pośrednio pochodnymi polskich źródeł genetycznych obu ważnych cech (niskie glukozyolany — odmiana Bronowski, zerowa zawartość kwasu erukowego — odmiana Liho wyselekcjonowana z materiałów wywiezionych z Polski w czasie wojny). Nasze materiały hodowlane rzepaku ozimego podwójnie ulepszonego trafiały też wielokrotnie do doświadczeń w Unii Euro-

pejskiej i zostały szeroko wykorzystane w tamtejszej hodowli. Dorobek ten może zostać na zawsze utracony, jeśli nasze odmiany zostałyby uznane za pochodne, ponieważ, zgodnie z wytycznymi ISF, status ten obowiązuje bezterminowo.

Co więc można zrobić by ratować polską hodowlę rzepaku?

Przede wszystkim należy zadbać by jak najwięcej polskich odmian zostało zarejestrowanych w kraju lub za granicą oraz by polscy hodowcy posiadali wyłączne prawo do ochrony tych odmian. Jest to sprawa kluczowa dla ochrony własności intelektualnej we współczesnym świecie. Nie można bowiem chronić czegoś, do czego w gruncie rzeczy nie posiada się zapewnionych praw. Żle się stało, że polskie prawo, w wyniku licznych zawirowań, nie zawsze zapewniało warunki dla właściwej ochrony własności intelektualnej hodowców odmian. Także obecnie nie wszyscy nasi hodowcy przykładają odpowiednią wagę do tego zagadnienia. W efekcie status naszych odmian jest często niejasny z prawnego punktu widzenia, stanowiąc tym samym łatwy cel dla prawników reprezentujących zachodnie koncerny nasienne.

Aby poprawić sytuację naszej hodowli można także próbować wywierać nacisk na gremia zajmujące się ustalaniem sposobów oceny statusu EDV rzepaku. Prace nad tymi zagadnieniami jeszcze trwają i ostateczne decyzje jeszcze nie zapadły. W interesie polskich hodowców rzepaku jest ustalenie stosunkowo wysokich wartości granicznych podobieństwa (nawet do 99%) oraz określenie w końcowym dokumencie możliwości rozszerzenia zestawu markerów służących ocenie tego podobieństwa. Pierwszy postulat jest łatwiejszy do osiągnięcia. Różnice w genomie rzepaku, spowodowane takimi praktykami hodowlanymi jak selekcja mutantów, inżynieria genetyczna, wielokrotne krzyżowanie wsteczne czy też selekcja nowych form w odmianach macierzystych, są stosunkowo niewielkie. Wysokie wartości graniczne podobieństwa powinny więc nadal spełniać swoją rolę przy odróżnianiu tych praktyk od metod mieszczących się w ramach normalnej praktyki hodowlanej. Drugi postulat będzie jednak o wiele trudniejszy do wprowadzenia. Celem prac prowadzonych przez grupę roboczą ISF jest znalezienie metody, która umożliwiłaby ochronę hodowców przed nieuprawnionymi praktykami hodowlanymi ze strony firm biotechnologicznych. Aby osiągnąć ten cel poszukuje się precyzyjnego kryterium, pozwalającego ocenić charakter nowej odmiany. Z góry zdefiniowany zestaw markerów jest takim właśnie precyzyjnym narzędziem. Zgoda na rozszerzenie tego zestawu spowoduje, że kryterium to stanie się nieostre i przestanie tym samym spełniać swoją rolę. Z tego też powodu można się spodziewać, że postulat ten nie znajdzie poparcia wśród członków grupy roboczej. Oczywiście nie oznacza to, że nie należy podejmować prób w celu uzyskania takiego zapisu w końcowym dokumencie, skoro byłoby to z korzyścią dla polskich hodowców. Równolegle warto też prowadzić badania w celu uzyskania własnego, rozszerzonego zestawu markerów do oceny podobieństwa odmian. Zestaw ten pozwoli na weryfikację wyników uzyskanych za pomocą „oficjalnych” markerów. Uzyskane wyniki będą stanowiły istotny argument w sytuacjach spornych, świadczący o rzeczywistym pokrewieństwie między odmianami oraz sposobie ich otrzymania.

Działając w imię ochrony polskich interesów należy postępować ostrożnie by „nie wylać dziecka z kąpielą”. Na pewno nie jest to łatwe zadanie, ponieważ wymaga ono pogodzenia ze sobą wielu sprzecznych dążeń. Trzeba wynegocjować jak najlepsze warunki by zapewnić dobrą przyszłość polskich hodowców, mając jednocześnie na uwadze rozwój hodowli w skali światowej.

Literatura

- Barret P., Chèvre A.M., Delourme R. 1995. Interspecific amplification of STMS (sequence tagged microsatellite site) between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus*. Proc. 9th International Rapeseed Congress, Cambridge, UK, July 1995, Vol. 4, J 43: 1187-1189.
- BrassicaDB, <http://jic-bioinfo.bbsrc.ac.uk/BrassicaDB>.
- Brunel D., Froger N., Pelletier G. 1999. Development of amplified consensus genetic markers (ACGM) in *Brassica napus* from *Arabidopsis thaliana* sequences of known biological function. *Genome*, 42: 387-402.
- Charters Y.M., Robertson M.J., Wilkinson M.J., Ramsay G. 1996. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *oleifera*) using 5'-anchored single sequence repeat (SSR) primers. *Theor. Appl. Genet.*, 92: 442-447.
- Dice L.R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26: 297-302.
- Figdore S.S., Kennard W.C., Song K.M., Slocum M.K., Osborn T.C. 1988. Assessment of the degree of restriction fragment length polymorphism in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.*, 75: 883-840.
- Foisset N., Delourme R., Barret P., Hubert N., Landry B.S., Renard M. 1996. Molecular-mapping analysis in *Brassica napus* using isozyme, RAPD and RFLP markers on a doubled-haploid progeny. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 1017-1025.
- Gower J.C. 1985. Measures of similarity, dissimilarity, and distance. In: Kotz S., Johnson N.L. *Encyclopedia of statistical sciences*. Wiley, New York, Vol. 5: 397-405.
- ISF 2003. ISF View on Intellectual Property. Adopted in Bangalore, June 2003.
- Jaccard P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Soc. Vaud. Sci. Nat. Bull.*, 44: 223-270.
- Jackson D.A., Somers K.M., Harvey H.H. 1989. Similarity coefficients: measures of co-occurrence and association or simply measures of occurrence? *Amer. Nat.*, 133: 436-453.
- Kresovich S., Szewc-McFadden A.K., Blick S.M., McFerson J.R. 1995. Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theor. Appl. Genet.*, 91: 206-211.
- Lagercrantz U., Ellegren H., Andersson L. 1993. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucl. Acids Res.*, 21: 111-1115.
- Lombard V., Baril C.P., Dubreuil P., Blouet F., Zhang D. 2000. Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars using AFLP: consequences for varietal registration. *Crop Sci.*, 40: 1417-1425.
- Nei M., Li W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)*, 76: 5269-5273.
- Rogers J.S. 1972. Measures of genetic similarity and genetic distance. *Studies in Genetics Univ of Texas Publ.*, 7213.

- Smith S. 1996. Essential derivation. NIAB BBP Satellite 1 Colloquium within the Generic Project Meeting: Molecular Tools for Biodiversity, Plant Variety Identification & Registration, Vienna, December 1996 (<http://www.niab.com/bbp/vienna.htm>) (opublikowane w Molecular Screening News, 11).
- Sokal R.R., Michener C.D. 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. Univ. Kansas Sci. Bull., 38: 1409-1438.
- Song K.M., Osborn T.C., Williams P.H. 1988. *Brassica* taxonomy based on nuclear fragment length polymorphisms (RFLPs). 1: Genome evolution of diploid and amphidiploid species. Theor. Appl. Genet., 75: 784-794.
- Szewc-McFadden A., Kresovich S., Bliet S., Mitchell S., McFerson J. 1996. Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated *Brassica* species. Theor. Appl. Genet., 93: 534-538.
- Uzunova M., Ecker W., Weissleder K., Röbbelen G. 1995. Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.). 1: Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content. Theor. Appl. Genet., 90: 194-204.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijnders M., van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucl. Acids Res., 23: 4407-4414.
- Welsh J., McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acid Research, 18 (24): 7213-7218.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research, 18 (22): 6531-6535.