

Агросистемы будущего

Генетика количественных признаков

УДК 635.127:577.152.31:577.151.64:577.21

doi: 10.15389/agrobiol.2019.3.469rus

QTL КАРТИРОВАНИЕ ИЗОФЕРМЕНТНЫХ ФОРМ ЭСТЕРАЗ
ЗРЕЛЫХ СЕМЯН У *Brassica rapa* L.А.С. РУДАКОВА¹, С.В. РУДАКОВ¹, А.М. АРТЕМЬЕВА², Д.А. ФАТЕЕВ²,
Н.В. КОЧЕРИНА³, Ю.В. ЧЕСНОКОВ³

С 1960-х годов изоферменты хорошо известны как одни из наиболее распространенных биохимических маркеров. Установление общей изменчивости изоферментных систем и выявление их генетического контроля сохраняют актуальность, позволяя вскрывать тонкие механизмы взаимоотношения организма с окружающей средой и гомеостаза и разрабатывать эффективные биохимические маркеры для экспресс-оценки генетически и селекционно значимого материала. В представленной работе нами впервые идентифицированы и картированы локусы хромосом, отвечающие за проявление активности 13 различных изоформ эстераз зрелых семян у *Brassica rapa* L. В исследовании использовали линии удвоенных гаплоидов двух картирующих популяций — DH30 и DH38. Все выявленные изоформы эстераз по электрофоретической подвижности подразделялись на три группы. Группа изоформ А1-А3 обладала большой молекулярной массой и малой электрофоретической подвижностью, группа изоформ В1-В7 характеризовалась средней молекулярной массой и проявляла среднюю электрофоретическую подвижность, группу С1-С3 составляли изоформы с малой молекулярной массой и, соответственно, наибольшей электрофоретической подвижностью. Каждая из родительских форм (как и каждая из исследованных линий картирующих популяций) имела уникальный электрофоретический спектр изоформ эстераз. На основании полученных электрофоретических данных для обеих популяций был проведен QTL-анализ и установлены локусы хромосом, определяющие проявление каждой изоформы эстеразы, выявленной у линий картирующих популяций DH30 и DH38. Использованный подход множественного интервального QTL-картирования (composite interval mapping) в сочетании с тестом пермутации (1000 повторений) при уровне статистической значимости $p < 0,05$ позволил идентифицировать и локализовать на хромосомах локусы (QTL, quantitative trait loci), определяющие проявление всех изоформ эстераз, идентифицированных методом гель-электрофореза. Исключение составили изоформы А1 для популяции DH38 и изоформы В7 для популяции DH30, для которых мы не получили результатов QTL-анализа из-за малого объема исходных данных по этим изоформам у соответствующей картирующей популяции. Всего картировали 35 QTL изоформ эстераз в случае картирующей популяции DH30 и 39 QTL для популяции DH38. В результате проведенного QTL-анализа выявили молекулярные маркеры, генетически сцепленные с идентифицированными локусами, и рассчитали процент фенотипической изменчивости, определяемый каждым из выявленных QTL. По данным изоферментного анализа был проведен расчет гетерозиготности для обеих популяций в каждом локусе H_I и общей гетерозиготности $H_{общ.}$, а также дисперсии гетерозиготности $Var(H_I)$ по одному локусу и дисперсии средней гетерозиготности внутри каждой из популяций $Var(H_{общ.})$. Выявленная гетерозиготность рассматривалась как средняя порция локусов с двумя различными аллелями в одном локусе у одной особи и могла быть определена как наблюдаемая гетерозиготность, характеризующая часть генов, по которым изучаемая популяция гетерозиготна. Показано, что в изученных популяциях линий удвоенных гаплоидов QTL, детерминирующие комплекс изоферментов эстераз, находятся в основном во 2-й, 4-й, 6-й и 9-й группах сцепления и формируют блоки коадаптированных генов и геномные коадаптированные блоки генов, что подчеркивает важность вклада этих локусов в онтогенез и адаптивность растений *B. rapa*. Выполненное молекулярно-генетическое картирование в сочетании с биохимическим анализом спектров изоформ эстераз зрелых семян у *B. rapa* позволили обнаружить генетические детерминанты, определяющие проявление изученных признаков, а также распределение картированных QTL по геному, что в перспективе дает возможность проводить эффективный молекулярно-генетический скрининг образцов коллекции и селекционного материала у вида *B. rapa* по изученным биохимическим признакам при генетико-селекционных исследованиях.

Ключевые слова: *Brassica rapa* L., биохимический анализ, эстеразы, изоформы, зрелые семена, картирование, QTL, гетерозиготность популяций.

С 1960-х годов изоферменты хорошо известны как одни из наиболее распространенных биохимических маркеров, пригодных для установления генетической изменчивости как в естественных, так и искусствен-

ных селекционно значимых популяциях растений (1-3) и животных (4-6). Установление общей изменчивости изоферментных систем и выявление их генетического контроля остается актуальным, поскольку исследование проблемы адаптации на биохимическом уровне позволяют не только вскрывать тонкие механизмы взаимоотношения организма с окружающей средой и сохранения гомеостаза в процессе роста и развития как в нормальных, так и экстремальных условиях (7), но и разрабатывать эффективные биохимические маркеры для экспресс-оценки генетически и селекционно значимого материала (8).

Эстеразы (ЕС 3.1.1.) объединяют большое число различных карбоксилэфирных гидролаз. Некоторые из них имеют очень широкую субстратную специфичность и способны гидролизовать как эндогенные, так и экзогенные эфиры связи различной структуры (9). Тот факт, что ферменты, которые показывают эстеразную активность, могут также гидролизовать и неэфирные связи, поднимает вопрос об эволюционной физиологической и адаптивно-экологической роли этих эстераз. Так, возможность ингибирования α - и β -эстераз в растениях была описана для арилэстераз в молодых листьях маниоки и оценена как маркер патогенеза после инфицирования бактериями (10). Тесты по ингибированию показали, что органофосфаты (инсектициды) ингибируют одни и активируют другие растительные эстеразы в *Aspidosperma polyneuron* (11). Следовательно, растительные эстеразы могут служить биохимическими индикаторами, используемыми для обнаружения инсектицидных остатков и определения их токсичности при контроле загрязнения окружающей среды. В целом эстеразная система организмов характеризуется присутствием большого ряда изоферментов и значительной индивидуальной и популяционной вариабельностью. У животных большинство эстеразных ферментов неспецифичны и демонстрируют перекрывающуюся субстратную специфичность (3). В некоторых случаях эти изоферменты относительно специфичны, как, например, холинэстеразы и карбонильные ангидразы.

Функциональная характеристика растительных эстераз пока недостаточно исследована, хотя у растений эстеразы, по-видимому, представляют одну из наиболее изучаемых групп изоферментов. Еще в конце 1960-х—начале 1970-х годов проводились исследования эстераз у кукурузы (1, 12, 13), ячменя (2), картофеля (14), хлопка (15, 16), овса (17, 18), сахарной свеклы (19), пшеницы (20, 21) и многих других видов. Наиболее подробно генетический контроль эстераз описан у пшеницы (21-25). Кроме того, определена «чужеродно»-пшеничная гомеология хромосом (4, 20) и идентифицированы «чужеродно»-пшеничные гибриды (26, 27), а также выявлена изменчивость эстераз у гексаплоидных генотипов (28). Все эти работы были направлены на установление не столько физиологической, сколько генетической составляющей такой биохимической системы, как эстеразы высших растений. Отсутствие эпистатических взаимодействий и доминантный характер наследования изоформ эстераз делают их удобным инструментом для быстрого и эффективного изучения процессов биохимической адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды. Такой тип биохимических маркеров удобен и для решения практических задач селекции в качестве средства, способного ускорить и упростить процесс отбора селекционно значимого материала.

В наших предшествующих исследованиях выявлен полиморфизм изоферментного профиля эстераз, выделенных из зрелых семян, у образцов сортового и линейного селекционного материала гексаплоидной мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.), при этом средняя гетерозиготность (H) об-

разцов по 10 выявленным локусам, кодирующим изоформы эстераз, составила 0,924 (29). Были выделены наиболее перспективные родительские формы, различающиеся по фенотипическим признакам селекционного интереса и по спектрам изоформ эстераз, — сорта Злата, Мера и гомозиготные линии АФИ91, АФИ177, ITMI7, ITMI44, ITMI83 и ITMI115 и установлена возможность определения полиморфизма эстераз в гибридных поколениях. В другом нашем исследовании (30) показан широкий спектр разнообразия электрофоретических профилей эстеразных изоферментов зрелых семян (восемь изоформ с молекулярными массами от 37,7 до 57,6 кД) у 25 образцов редиса (*Raphanus sativus* L.), которые были разделены на 13 электрофоретических зимотипов, отличающихся друг от друга наличием или отсутствием определенных зон. Наиболее распространенным был электрофоретический зимотип Гр. 1, который имели 24 % оцененных образцов. Зимотип Гр. 5 характеризовался максимальным числом зон — 8, зимотипы Гр. 3 и Гр. 12 — наименьшим (по 4). Мономорфными оказались седьмая и восьмая зоны эстераз (соответственно $M_r = 39,7$ кД и $M_r = 37,7$ кД), остальные шесть зон были полиморфными, при этом частота каждой зоны для различных зимотипов варьировала от 6,58 до 17,11 %. Полученные результаты позволили выделить перспективный исходный материал для селекции.

Однако до настоящего времени не было проведено ни одного исследования линий удвоенных гаплоидов по изоферментному спектру эстераз. Преимущество такого подхода заключается в том, что, например, молекулярно-генетические карты картирующих популяций *Brassica rapa* L. DH30 и DH38 насыщены SSR и AFLP молекулярными маркерами с интервалом картирования 2,4–2,6 сМ. Чем плотнее расположены маркеры, тем точнее карта. AFLP маркеры в настоящее время относительно редко, но все же используются в комплексе с маркерами других типов. В то же время в отсутствие других известных маркеров изоформ эстераз в перспективе для рутинного скрининга селекционного или иного генетического материала можно конвертировать AFLP маркеры, расположенные в пиках выявленных QTL, в SCAR или CAPS маркеры. Все это позволяет снять вопрос о надежности и воспроизводимости результатов при использовании маркеров, полученных с использованием определенного генетического материала, поскольку такой вопрос возникает очень часто, если не всегда (29–31). Различное положение локусов количественных признаков селекционного интереса в упомянутых популяциях DH30 и DH38 отмечено во многих исследованиях, что совершенно естественно, так как генетически популяции различны (31). Но тем это интереснее, поскольку для массового селекционного или селекционного скрининга наиболее надежны маркеры локусов, находящихся в близких позициях в обеих популяциях.

В настоящей работе мы впервые провели изоферментный анализ у линий удвоенных гаплоидов *Brassica rapa* L., что позволило не только идентифицировать локализацию локусов, определяющих проявление анализируемых изоформ эстераз, в группах сцепления на хромосомах, но и найти статистические взаимосвязи между выявленными QTL (quantitative trait loci) этих изоферментов и наблюдаемой гетерозиготностью для каждого локуса.

Целью работы было картирование QTL, определяющих проявление различных изоформ эстераз зрелых семян у линий удвоенных гаплоидов *Brassica rapa* L.

Методика. Эстеразные профили семян анализировали у 80 линий картирующих популяций *Brassica rapa* L. (3 родительские формы, 50 линий потомства DH38 и 27 линий потомства DH30). Подробности получения и использования популяций DH30 и DH38 для картирования QTL морфоло-

гических и биохимических признаков у *B. rapa* описаны нами ранее (31).

Зрелые семена тщательно размалывали в фарфоровой ступке, по 100 мг полученной муки помещали в пробирки типа эппендорф, добавляли по 1 мл гексана, тщательно перемешивали и оставляли для обезжиривания на ночь в холодильнике при 4 °С, затем центрифугировали 10 мин при 15 тыс. об/мин, надосадочную жидкость сливали и оставляли пробы под тягой для высушивания на воздухе. Ферменты экстрагировали из обезжиренных и высушенных образцов 0,05 М Трис-НСI буфером при рН 8,3 в присутствии 2-меркаптоэтанола (2 мкл/мл) и глицерина (10 %). Соотношение мука:буфер составляло 1:4, продолжительность экстракции — 14–18 ч при температуре в интервале от 4 до 8 °С. Образцы центрифугировали 10 мин, отбирали надосадочную жидкость и замораживали пробы при –20 °С для предотвращения инактивации изоферментов при хранении. Перед внесением в камеру для электрофореза образцы размораживали при комнатной температуре. Изоферменты разделяли методом нативного вертикального электрофореза в ПААГ (32), концентрация разделяющего и концентрирующего гелей — соответственно 11 и 5 %. Электрофорез осуществляли в камере Mini-PROTEAN Tetra Cell («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). В качестве маркеров молекулярных масс использовали Prestained Protein Ladder («Thermo Scientific», США). В каждый карман концентрирующего геля вносили по 20 мкг белка. Предварительно концентрацию белка в ферментных препаратах определяли методом связывания красителя по М.М. Bradford (33), в качестве стандарта использовали бычий сывороточный альбумин («Promega Corporation», США). Электрофорез проводили на холоде (10–15 °С), при 10 В/см в течение 2,5 ч. По окончании деления гель обрабатывали реактивом на неспецифическую эстеразу (34). Для этого гель выдерживали в свежеприготовленном растворе красителя, состоящем из 100 мг α -нафтилацетата и 120 мг β -нафтилацетата («Sigma-Aldrich Chemie GmbH», Швейцария), растворенных в 10 мл 70 % этанола; 500 мг Fast Blue RR («Sigma-Aldrich Co.», США); 4 мл пропанола и 60 мл 0,1 М фосфатного буфера рН 6,0. После появления коричневато-фиолетовых полос избыток красителя отмывали 10 % уксусной кислотой. Полученные зимограммы сканировали (Epson Expression 10000XL, «GE Healthcare», США). Оценку каждого образца (значение R_f всех полос в треке, расчет молекулярных масс по стандартам, расчет относительного количества каждой зоны в треке) проводили с использованием программы Phoretix 1D Advanced («TotalLab, Ltd», Великобритания).

Для картирования выявленных QTL использовали компьютерную программу MAPQTL 6.0 («Kwazma B.V.», Нидерланды) (35), с помощью которой установили присутствие и расположение QTL-кандидатов в группе сцепления (интервал картирования 5 сМ), значения LOD (logarithm of odds) ($p = 0,05$) и степень фенотипического проявления признаков (% Expl.), которые объясняются соответствующим QTL, для каждой изоформы эстеразы в каждой популяции. Значимость LOD устанавливали в тесте пермутации (1000 повторений) (36).

Коэффициент корреляции признак—маркер рассчитывали для уровня значимости $p = 0,05$ как статистически достоверное сцепление маркерного локуса с QTL, определяющим изучаемый признак, на основе эмпирически полученных вариантов для каждой пары признак—маркер (37). Используя данные по картированию выявленных QTL, выполняли графическое построение молекулярно-генетических карт с помощью компьютерной программы MapChart 2.2 (<https://www.wur.nl/en/Research-Results/Research-Institutes/plant-research/biometris/Software-Service.htm>) (38). Статистическую об-

работку данных проводили методами многофакторного анализа (35).

Определяли степень наблюдаемой гетерозиготности H для каждого локуса, а также ее среднее значение по нескольким локусам (общая гетерозиготность $H_{общ.}$). Гетерозиготность популяции в каждом локусе H_l и общую гетерозиготность $H_{общ.}$ рассчитывали в соответствии с описанием (39, 40) по следующим формулам:

$$H_l = 2n(1 - \sum_k x_k^2)/2n - 1,$$

$$H_{общ.} = \sum_{l=1}^r H_l/r,$$

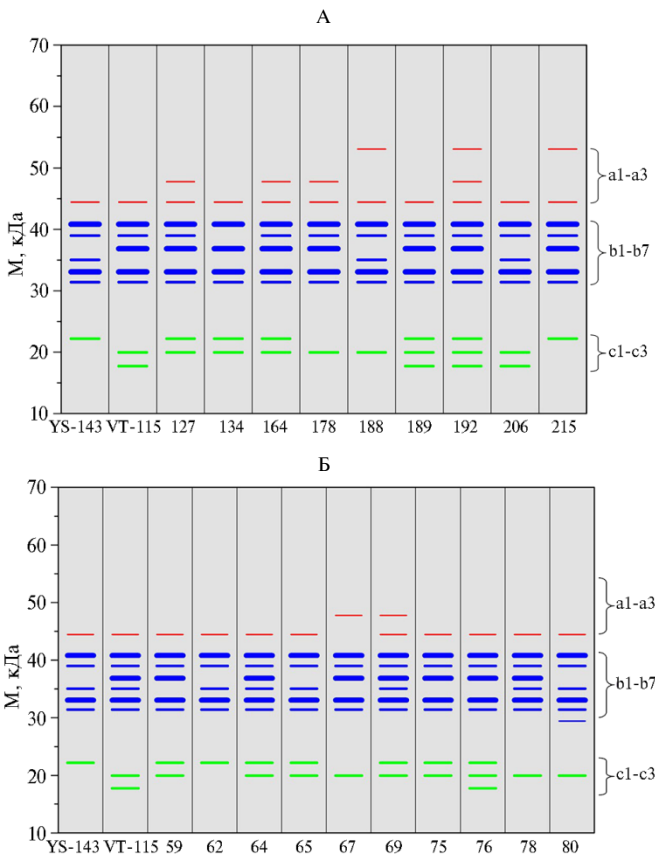
где l — порядковый номер локуса, n — размер популяции, x_k — оцениваемая частота k -го аллеля l -го локуса, r — общее число локусов.

Находили дисперсии гетерозиготности $Var(H_l)$ по одному локусу и дисперсию средней гетерозиготности внутри популяции $Var(H_{общ.})$ (41):

$$Var(H_l) = H_l(1 - H_l)/n,$$

$$Var(H_{общ.}) = \frac{1}{nr^2} \sum_l H_l(1 - H_l) + \frac{1}{nr^2} \sum_l \sum_{l \neq i} (H_{il} - H_l H_i),$$

Результаты. Электрофоретический анализ изоферментов эстераз зрелых семян у линий удвоенных гаплоидов из двух картирующих популяций *B. rapa* и их трех родительских форм выявил 13 изоформ эстеразных ферментов, которые подразделялись на три группы по электрофоретической подвижности (рис. 1).



Группа изоформ А1-А3 обладала большой молекулярной массой и малой электрофоретической подвижностью, группа В1-В7 проявляла среднюю молекулярную массу и среднюю подвижность, изоформы группы С1-С3 имели малую молекулярную массу и самую высокую электрофоретическую подвижность. Следует отметить, что интенсивность зон А1-А3 и С1-С3 варьировала относительно слабо, а В1-В7 — значительно. Кроме того, в отличие от групп А1-А3 и С1-С3, включавших по три изоформы, группа В1-В7 была представлена семью различными изоформами эстраз.

Рис. 1. Схемы электрофореграмм изоформ эстераз в картирующих популяциях ДН30 (А) и ДН38 (Б) *Brassica rapa* L.: YS-143 — отцовская форма, VT-115, РС-175 — материнские формы; цифры внизу — номера линий картирующих популяций; А1-А3, В1-В7 и С1-С3 — группы изоформ эстераз соответственно с большой, средней и малой молекулярной массой; М — маркер молекулярных масс Prestained Protein Ladder («Thermo Scientific», США).

Каждая из родительских форм, как и каждая из исследованных линий картирующих популяций, обла-

дала своим уникальным электрофоретическим спектром изоформ эстераз. Группа С1-С3 состояла из изоформ, присущих как отцовскому, так и каждому из материнских образцов. У этой группы эстераз проявлялся кодоминантный тип наследования. Группа В1-В7 у родительских форм состояла из шести электрофоретических зон, пять из которых были идентичны, а зона В3, отсутствовавшая у отцовских растений YS-143, присутствовала у обеих материнских форм — VT-115 и PC-175, проявляя доминантный тип наследования. В случае популяции ДН30 зона В4 имела у отцовской формы YS-143 и отсутствовала у материнской VT-115, также проявляя при этом доминантный тип наследования. У линии 97 картирующей популяции ДН30, а также у линий 80, 123, 127 и 136 картирующей популяции ДН38 обнаруживалась изоформа В7, отсутствующая у всех трех родительских форм. Появление этой изоформы у перечисленных пяти линий, по-видимому, объясняется трансгрессивным характером генетических перестроек или изменений в геноме этих линий, произошедших в процессе их создания и отбора в культуре *in vitro*, то есть вследствие соматональной изменчивости. Не исключено также, что это одна из идентифицированных ранее у *Brassicaceae* синапинэстераз (42). То же самое можно сказать в отношении изоформ А1 и А2, выявленных у ряда линий как в популяции ДН30, так и в популяции ДН38. Необходимо отметить, что изоформа А3 присутствует у всех трех родительских форм и отсутствует у линий 28 и 67 из популяции ДН30, а также линий 1, 4, 67, 90, 124 и 134 из популяции ДН38. Наличие изоформ А1 и А2 у различных линий обеих популяций варьировало. Их присутствие у той или иной линии, по-видимому, объясняется теми же причинами, что и появление изоформы В7.

На основании электрофореграмм для обеих популяций провели QTL-анализ и установили локусы хромосом, определяющие появление каждой изоформы эстеразы, обнаруженной у линий картирующих популяций ДН30 и ДН38 (табл. 1, см. на сайте журнала <http://www.agrobiology.ru>).

Использованный нами множественного интервального QTL-картирования (*composite interval mapping*) в сочетании с тестом пермутации (1000 повторений) при уровне значимости $p < 0,05$ позволил идентифицировать и локализовать на хромосомах локусы (QTL), определяющие появление всех идентифицированных гель-электрофорезом изоформ эстераз (см. рис. 1), за исключением А1 для популяции ДН38 и В7 — для ДН30. Для этих двух изоформ мы не получили результатов QTL-анализа из-за малого объема соответствующих исходных данных по каждой картирующей популяции.

По результатам QTL-картирования выявлены молекулярные маркеры, генетически сцепленные с идентифицированными локусами, что в перспективе может использоваться для молекулярно-генетического анализа образцов *B. rapa*, и установлена локализация обнаруженных QTL в группах сцепления (рис. 2, см. на сайте журнала <http://www.agrobiology.ru>). Так, в популяции ДН30 для изоформы А1 были идентифицированы семь локусов хромосом, определяющих ее проявление. Максимальные LOD значения установили для 1-й (3,70) и 5-й (3,76) групп сцепления. Для А2 в популяции ДН30 обнаружили три, а в популяции ДН38 — шесть локусов, определяющих проявление этой изоформы. Необходимо отметить, что расположение QTL изоформы А2 на 4-й и 9-й хромосомах совпадало в обеих популяциях, указывая на эволюционное закрепление этого признака, имевшего, по-видимому, адаптивное значение. Максимальную величину LOD (2,09) в популяции ДН30 установили для 9-й хромосомы, а для ДН38 полученные LOD значения варьировали от 2,28 до 4,88 для разных групп сцепления. В противоположность этому величина LOD для изоформы А3 оказа-

лась сравнительно низкой — 1,29 для единственного QTL в популяции ДН30 и 1,30-1,79 для QTL, выявленных в ДН38, однако на долю фенотипической изменчивости, которую определяли QTL, идентифицированные для изоформы А3, приходилось 23,4 % в популяции ДН30 и 14,6-19,5 % в случае ДН38.

Изоформа В1 тоже характеризовалась низким значением LOD для обеих популяций — 1,36-1,53 и 1,33-1,75 при доле фенотипической изменчивости 20,2-25,4 и 13,3-17,1 % соответственно для ДН30 и ДН38. Всего же картировали три QTL у популяции ДН30 и две — у ДН38. QTL изоформы В3 не были многочисленными и имели невысокие значения LOD. Так, для ДН30 они составили соответственно 2,00 и 1,37-2,53, для ДН38 — 4,00 и 1,32-1,78. Однако для В3, как и для А2, месторасположение QTL, картированных в 6-й группе сцепления, совпадало, что указывает на эволюционно-адаптивный характер этой изоформы. Число QTL, определяющих экспрессию изоформы В2, также было невелико — четыре для популяции ДН30 и две — для ДН38. Однако величина LOD (1,36-3,36 и 1,93-2,47 соответственно для ДН30 и ДН38) и доля контролируемой фенотипической изменчивости (соответственно 23,9-48,0 и 19,9-24,8 %) были выше, чем в случае В3. Практически такие же результаты получили для изоформы В4. Для нее выявили по два QTL в каждой из картирующих популяций. Величина LOD и доля фенотипической изменчивости при этом варьировали в пределах 1,48-1,55 и 46,1-47,8 % для ДН30, 1,33-1,49 и 20,3-22,4 % — для ДН38. Изоформа В5, хотя и имела невысокие LOD (1,32-1,52 и 1,93-2,07 соответственно для ДН30 и ДН38) при небольшом проценте фенотипической изменчивости (22,3-25,3 и 18,3-19,5 %), но, как и В3, имела QTL, локализованный у обеих популяций в 6-й группе сцепления в близких позициях, чем подтверждается наше заключение об эволюционно-адаптивном характере наследования этих изоформ эстераз семян у *V. rapa*. У популяции ДН30 мы идентифицировали пять QTL изоформ В6 на 3-й, 6-й, 7-й и 8-й хромосомах, у ДН38 — три QTL в 8-й, 9-й и 10-й группах сцепления. LOD при этом были относительно невелики — соответственно 1,31-1,84 и 1,31-1,48, доля фенотипической изменчивости — 23,9-29,7 и 11,9-14,9 % для ДН30 и ДН38. Интересно отметить, что для популяции ДН30 выявленный в 6-й группе сцепления QTL располагался в том же месте, что и QTL изоформы В5, что свидетельствует о важности этого хромосомного локуса у *V. rapa*. Изоформу В7 идентифицировали и картировали только у популяции ДН38. Всего локализовали пять QTL, которые располагались на 1-й, 2-й, 7-й и 9-й хромосомах. Значения LOD варьировали от 1,53 до 2,13, доля фенотипической изменчивости, обусловленной выявленными QTL, составила от 82,8 до 91,4 %.

Для С1 в каждой из картирующих популяций обнаружили всего по одному QTL. При этом значения LOD (1,39 и 1,32 для ДН30 и ДН38) и процент фенотипической изменчивости, обусловленной соответствующим QTL (32,9 и 18,9 %), были относительно невелики. QTL С2 идентифицировали у ДН30 во 2-й, 4-й и 5-й группах сцепления (1,46-2,20 и 31,2-43,0 %), у ДН38 — в 3-й и 8-й группах (1,29-2,31 и 18,2-30,7 %). У изоформы С3 картировали три QTL в популяции ДН30 и четыре QTL — у ДН38. При этом значения LOD идентифицированных QTL варьировали в пределах 1,50-2,77 для ДН30 и 1,51-2,51 — для ДН38, а доля обусловленной фенотипической изменчивости у ДН30 и ДН38 составила соответственно 68,5-88,1 и 43,3-65,0 %. QTL изоформы С3, картированный на 2-й хромосоме (как и в случае А2, В3 и В5), идентифицировали у обеих картирующих популяций. Этот факт подтверждает, что указанный локус 2-й хро-

мосомы имеет эволюционное значение и его структура была закреплена в процессе онтогенетической и филогенетической адаптации у вида *B. rapa*. По всей вероятности, именно с такими адаптивно значимыми локусами хромосом связана стабильность характерных морфологических и биохимических признаков растения, а возможно, и повышенная адаптационная способность к неблагоприятным факторам окружающей среды (43-45).

2. Показатели гетерозиготности и ее дисперсии у линий картирующих популяций DH30 и DH38 *Brassica rapa* L. по результатам изоферментного анализа эстераз

| Показатель | Изоформа эстераз | | | | | | | | | | | | |
|---|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|----|-------|-------|-------|-------|
| | A1 | A2 | A3 | B1 | B2 | B3 | B4 | B5 | B6 | B7 | C1 | C2 | C3 |
| Картирующая популяция DH30 | | | | | | | | | | | | | |
| H_i | 0,352 | 0,616 | 0,139 | 0 | 0,139 | 0,475 | 0,491 | 0 | 0 | 0,073 | 0,475 | 0,391 | 0,391 |
| $Var(H_i)$ | 0,008 | 0,009 | 0,004 | 0 | 0,004 | 0,009 | 0,009 | 0 | 0 | 0,002 | 0,009 | 0,009 | 0,009 |
| Средняя гетерозиготность $H_{общ.} = 0,272$; дисперсия $Var(H_{общ.}) = 0,007$ | | | | | | | | | | | | | |
| Картирующая популяция DH38 | | | | | | | | | | | | | |
| H_i | 0 | 0,213 | 0,213 | 0,078 | 0,149 | 0,424 | 0,476 | 0 | 0 | 0,149 | 0,465 | 0,465 | 0,368 |
| $Var(H_i)$ | 0 | 0,003 | 0,003 | 0,001 | 0,002 | 0,005 | 0,005 | 0 | 0 | 0,002 | 0,005 | 0,005 | 0,005 |
| Средняя гетерозиготность $H_{общ.} = 0,231$; дисперсия $Var(H_{общ.}) = 0,003$ | | | | | | | | | | | | | |

По данным изоферментного анализа мы рассчитали гетерозиготность популяций по каждому локусу H_i и общую гетерозиготность $H_{общ.}$, а также дисперсию гетерозиготности $Var(H_i)$ по одному локусу и дисперсию средней гетерозиготности внутри каждой из популяций $Var(H_{общ.})$ (табл. 2).

Поскольку дисперсия средней гетерозиготности должна учитывать ковариации между гетерозиготностями по разным локусам (I и \hat{I}), что обусловлено их зависимостью от частоты двойных гетерозигот H_{ii} по этим локусам, использовали формулу, предложенную Б. Вейром (41). Выявленная гетерозиготность рассматривалась как средняя порция локусов с двумя различными аллелями в одном локусе у одной особи и могла быть определена как наблюдаемая гетерозиготность, характеризующая часть генов, по которым изучаемая популяция гетерозиготна. Используемые нами формулы (39-41) дают возможность рассчитать любой многочлен в наборе переменных, распределенных мультиномиально, что, в свою очередь, позволяет рассматривать выявляемую гетерозиготность как меру информационного полиморфизма, широко используемого при составлении и реализации генетико-селекционных программ. Формирование любых селекционно значимых свойств зависит от генотипа особи (46, 47). При этом информационный полиморфизм есть не что иное, как отражение фенотипических проявлений распределенных в геноме генетических детерминант (генов, локусов хромосом), определяющих изучаемые признаки (48).

Таким образом, мы впервые картировали QTL, детерминирующие биохимические признаки — спектры изоформ эстераз зрелых семян у картирующих популяций удвоенных гаплоидов *B. rapa* и выявили молекулярные маркеры, генетически сцепленные с QTL этих признаков, что позволяет проводить эффективный молекулярно-генетический скрининг образцов коллекций и селекционного материала. Механизмы, которые контролируют биосинтез и накопление таких биологически активных веществ, как изоферменты, определяющие биохимическую характеристику морфотипов, складываются в результате эволюционно-адаптивного формирования и наследования. Модификация этих механизмов может приводить к резкому изменению количества и набора изоферментов в различных органах, в частности в семенах, что, в свою очередь, у *B. rapa* сказывается на морфологических и адаптивных качественных признаках вида. Изучение

генетических детерминант изоформ эстераз в перспективе может позволить управлять процессом генетической изменчивости по этим адаптивно значимым признакам посредством объединения в одном организме различных генетических производных от разных родительских форм. Анализ генетической изменчивости очень важен для понимания генетики количественных признаков, играющих ключевую роль в селекционных программах по улучшению экономически значимых свойств у *B. rapa*. В итоге было бы крайне важно определить функции генов, влияющих на их проявление, молекулярно-генетические механизмы экспрессии и, наконец, охарактеризовать молекулярную изменчивость геномов внутри и за пределами вида. Интересно отметить, что схожие данные ранее нами были получены для пшеницы (29) и редиса (30), у которых также выявлен полиморфизм между образцами перспективного селекционного материала по спектрам изоферментных форм эстераз зрелых семян. Кроме того, эти результаты перекликаются с описанными при анализе эстеразно-липазного генного семейства у *Arabidopsis thaliana* (49) и *Olea europaea* (50). Данные, полученные на перечисленных видах (как в настоящем исследовании, так и ранее), в перспективе, как мы полагаем, позволят установить генетико-эволюционные и филогенетические взаимосвязи строения и функционирования геномов у одно- и двудольных растений.

Следует отметить обнаруженное нами совпадение позиций локусов, которые контролируют изоферментные профили эстераз и другие биохимические признаки, исследованные нами ранее, — содержание свободных аминокислот, фенольных соединений, каротиноидов и хлорофиллов. Эти локусы локализованы в нижней части хромосомы A03, где находится ген перехода к цветению *BrFLC5*, а также в середине и в нижней части группы сцепления A06 (31).

Итак, молекулярно-генетическое картирование и анализ спектров изоформ эстераз зрелых семян у *Brassica rapa* выявили генетические детерминанты этих признаков. Установлено распределение картированных QTL по геному. Показано, что в изученных популяциях линий удвоенных гаплоидов QTL, детерминирующие комплекс изоферментов эстераз, находятся в основном во 2-й, 4-й, 6-й и 9-й группах сцепления и формируют блоки коадаптированных генов и геномные коадаптированные блоки генов, что подчеркивает важность вклада этих локусов в онтогенез и адаптивность растений *B. rapa*. В целом совпадение локализации обнаруженных QTL поддерживает наблюдаемые биохимические корреляции (например, расположение изоформ эстераз на электрофореграмме), а блоки генов, объединенные в геномные районы в группах сцепления A02, A03, A04, A06 и A09 и в QTL, идентифицированные в группах сцепления, отражают генетические корреляции между такими признаками, как спектры изоформ эстераз, и иными биохимическими свойствами растений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Schwartz D., Fuehsman C., McGrath H.K. Allelic isozymes of the pH 7.5 esterases in maize. *Genetics*, 1965, 52: 1265.
2. Solari R.M., Favret E.A. Polymorphism in endosperm proteins of barley and its genetic control. In: *Barley genetics II* /R. Nilan (ed.). Washington University Press, Pulman WA, 1971: 23-31.
3. Artemova N.V. Chromosomal control of the isoenzymes of alcohol dehydrogenase, esterase and amylase in different rye varieties. *Genetika*, 1982, 18: 661-667.
4. Coates P.M., Mestriner M.A., Hopkinson D.A. A preliminary genetic interpretation of the es-

- terase isozymes of human tissues. *Ann. Hum. Genet.*, 1975, 39: 1-20 (doi: 10.1111/j.1469-1809.1975.tb00103.x).
5. Lith H.A., Bieman M., Zutphen B.F.M. Purification and molecular properties of rabbit liver esterase ES-1A. *Eur. J. Biochem.*, 1989, 184: 545-551 (doi: 10.1111/j.1432-1033.1989.tb15048.x).
 6. Deimilling O., Wassmer B. Genetic characterization of esterase-28 (ES-28) of the house mouse. *Biochem. Genet.*, 1991, 29: 55-64 (doi: 10.1007/BF00578240).
 7. Иваченко Л.Е. Роль множественных форм ферментов сои в процессе биохимической адаптации к условиям выращивания. *Успехи современного естествознания*, 2010, 9: 96-98.
 8. Чесноков Ю.В. *Молекулярно-генетические маркеры и их использование в предселекционных исследованиях*. СПб, 2013.
 9. Walker C.H., Macknees M.I. Esterases: problems of identification and classification. *Biochem. Pharmacol.*, 1983, 32: 3265-3269.
 10. Pereira A.J., Lapenta A.S., Vidigal-Filho P.S., Machado M.F.P.S. Differential esterase expression in leaves of *Manihot esculenta* Crantz infected by *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Biochem. Genet.*, 2001, 39: 289-296 (doi: 10.1023/A:1012251228986).
 11. Carvalho V.M., Marques R.M., Lapenta A.S., Machado M.F. Functional classification of esterases from leaves of *Aspidosperma polyneuron* M. Arg. (*Apocynaceae*). *Genet. Mol. Biol.*, 2003, 26(2): 195-198 (doi: 10.1590/S1415-47572003000200013).
 12. MacDonald T., Brewbaker J. Isoenzyme polymorphism in flowering plants. VIII. Genetic control and dimeric nature of transaminase hybrid maize isoenzymes. *J. Hered.*, 1972, 63: 11-14 (doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a108209).
 13. Scandalios J.G. Genetic control of multiple molecular forms of enzymes in plants. *Biochem. Genet.*, 1969, 3: 37-79 (doi: 10.1007/BF00485973).
 14. Desborough S., Peloquin J. Esterases isozymes from *Solanum* tubers. *Phytochemistry*, 1967, 6: 1398-1402 (doi: 10.1016/S0031-9422(00)86051-3).
 15. Cherry J.P., Katterman F.R.H., Endrizzi J.E. Comparative studies of seed proteins of species of *Gossypium* by gel electrophoresis. *Evolution*, 1970, 24: 231-447 (doi: 10.2307/2406817).
 16. Cherry J.P. A comparative study of seed proteins of allopolyploids of *Gossypium* by gel electrophoresis. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 1971, 13: 155-158 (doi: 10.1139/g71-024).
 17. Marshall D.R., Allard R.W. Isozyme polymorphism in natural populations of *Avena fatua* and *A. barbata*. *Heredity*, 1970, 25: 273-282 (doi: 10.1038/hdy.1970.38).
 18. Murray B.E., Craig I.L., Rajhathy T. A protein electrophoretic study of three amphidiploids and eight species of *Avena*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 1970, 12: 651-665 (doi: 10.1139/g70-085).
 19. Lerch B., Wolf G. Isolation of phosphodiesterase from sugar beet leaves. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Enzymology*, 1972, 258: 200-218 (doi: 10.1016/0005-2744(72)90979-5).
 20. Barber H.N., Driscoll C.J., Vickery R.S. Enzymic markers for wheat and rye chromosomes. In: *Proceedings III International Wheat Genetics Symposium*. Canberra, 1968: 116-122.
 21. May C.E., Vickery R.S., Driscoll C.S. Gene control in hexaploid wheat. In: *Proceedings 4th International Wheat Genetics Symposium*. Columbia, 1973: 843-849.
 22. Nakai Y. Isozyme variations in *Aegilops* and *Triticum*. 2. Esterase and acid phosphatase isozymes studied by the gel isoelectrofocusing method. *Seiken Zoho*, 1973, 24: 45-73 (doi: 10.1038/hdy.1977.102).
 23. Nakai Y. Isozyme variations in *Aegilops* and *Triticum*. 3. Chromosomal basis of the esterase isozyme production in different organs of Chinese spring wheat. *Bot. Mag. Tokyo*, 1976, 89(3): 219-234 (doi: 10.1007/BF02488344).
 24. Cubadda R., Bozzini A., Quattrucci E. Genetic control of esterases in common wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 1975, 45: 290-293 (doi: 10.1007/BF00276681).
 25. Jaaska V. Electrophoretic survey of seedling esterases in wheats in relation to their phylogeny. *Theor. Appl. Genet.*, 1980, 56: 273-284 (doi: 10.1007/BF00282570).
 26. Fedak G. Increased homoeologous chromosome pairing in *Hordeum vulgare* × *Triticum aestivum* hybrids. *Nature*, 1977, 266: 529-530 (doi: 10.1007/BF00264329).
 27. Fejer O., Belea A. Cytology and isoenzymes of some *Triticum* auto- and amphidiploids. *Wheat Information Service*, 1978, 47/48: 41-44.
 28. Alexandrescu N., Saulescu N. Esterase variability in kernels of *Triticum aestivum* cultivars. *Revue roumaine de biochimie*, 1982, 19: 93-100.
 29. Рудакова А.С., Рудаков С.В., Давыдова Н.В., Мирская Г.В., Журавлева Е.В., Чесноков Ю.В. Изоферментный анализ эстераз в зрелых семенах гексаплоидной мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *Сельскохозяйственная биология*, 2016, (51)3: 327-334 (doi: 10.15389/agrobiology.2016.3.327rus).
 30. Рудакова А.С., Рудаков С.В., Артемьева А.М., Курина А.Б., Кочерина Н.В., Чесноков Ю.В. Изучение полиморфизма эстеразного состава зрелых семян образцов редиса (*Raphanus sativus* L.) коллекции ВИР. *Овощи России*, 2017, 5: 3-8 (doi: 10.18619/2072-9146-2017-5-3-8).

31. Артемьева А.М., Соловьева А.Е., Кочерина Н.В., Беренсен Ф.А., Руднева Е.Н., Чесноков Ю.В. Картирование хромосомных локусов, определяющих проявление морфологических и биохимических признаков качества у культур вида *Brassica rapa* L. *Физиология растений*, 2016, 63: 275-289 (doi: 10.7868/S0015330316020044).
32. Davis B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. *Annals of the NY Academy of Science*, 1964, 121: 404-427 (doi: 10.1111/j.1749-6632.1964.tb14213.x).
33. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254 (doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3).
34. Meon S. Protein, esterase and peroxidase patterns of phytophthora isolates from Cocoa in Malaysia. *Journal of Islamic Academy of Sciences*, 1988, 1(2): 154-158.
35. Van Ooijen J.W. *MapQTL 6. Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species*. Wageningen, Netherlands, 2009.
36. Kocherina N.V., Artemyeva A.M., Chesnokov Yu.V. Use of LOD-score technology in mapping quantitative trait loci in plants. *Russian Agricultural Sciences*, 2011, 37: 201-204 (doi: 10.3103/S1068367411030098).
37. Ronald P.S., Penner G.A., Brown P.D., Brule-Babel A. Identification of RAPD markers for percent hull in oat. *Genome*, 1997, 40: 873-878 (doi: 10.1139/g97-813).
38. Voorrips R.E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered.*, 2002, 93: 77-78 (doi: 10.1093/jhered/93.1.77).
39. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89(3): 583-590.
40. Lefèvre F., Charrie A. Isozyme diversity within African *Manihot* germplasm. *Euphytica*, 1992, 66: 73-80 (doi: 10.1007/BF00023510).
41. Вейр Б. *Анализ генетических данных*. М., 1995: 132-135.
42. Clauss K., Baumert A., Nimtz M., Milkowski C., Strack D. Role of a GDLS lipase-like protein as sinapine esterase in Brassicaceae. *Plant J.*, 2008, 53(5): 802-813 (doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03374.x).
43. De Souza A., Hull P.A., Gille S., Pauly M. Identification and functional characterization of the distinct plant pectin esterases PAE8 and PAE9 and their deletion mutants. *Planta*, 2014, 240(5): 1123-1138 (doi: 10.1007/s00425-014-2139-6).
44. Biely P. Microbial carbohydrate esterases deacetylating plant polysaccharides. *Biotechnol. Adv.*, 2012, 30(6): 1575-1588 (doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.04.010).
45. Gao Z., Qian Q., Liu X., Yan M., Feng Q., Dong G., Liu J. Dwarf 88, a novel putative esterase gene affecting architecture of rice plant. *Plant Molecular Biology*, 2009, 71(3): 265-276 (doi: 10.1007/s11103-009-9522-x).
46. Сандухадзе Б.И., Журавлева Е.В., Кочетыгов Г.В. *Озимая пшеница Нечерноземья в решении продовольственной безопасности Российской Федерации*. М., 2011.
47. Casacuberta J.M., Jackson S., Panaud O., Purugganan M., Wendel J. Evolution of plant phenotypes, from genomes to traits. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2016, 6(4): 775-778 (doi: 10.1534/g3.115.025502).
48. Yang W., Guo Z., Huang C., Duan L., Chen G., Jiang N., Fang W., Feng H., Xie W., Lian X., Wang G., Luo Q., Zhang Q., Liu Q., Xiong L. Combining high-throughput phenotyping and genome-wide association studies to reveal natural genetic variation in rice. *Nature Communications*, 2014, 5: 5087 (doi: 10.1038/ncomms6087).
49. Lai C.P., Huang L.M., Chen L.O., Chan M.T., Shaw J.F. Genome-wide analysis of GDLS-type esterases/lipases in Arabidopsis. *Plant Mol. Biol.*, 2017, 95(1-2):181-197 (doi: 10.1007/s11103-017-0648-y).
50. Rejyn J.D., Zienkiewicz A., Rodríguez-García M.I., Castro A.J. Profiling and functional classification of esterases in olive (*Olea europaea*) pollen during germination. *Ann. Bot.*, 2012, 110(5): 1035-1045 (doi: 10.1093/aob/mcs174).

¹Universitatea de Stat din Moldova,
Republic of Moldova, MD-2009, Chişinău, Mateevich str., 60,
e-mail: rud-as@mail.ru, rudacov@yahoo.com;

²ФГБНУ ФИЦ Всероссийский институт
генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова,
190000 Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42-44,
e-mail: furriongo@gmail.com, akme11@yandex.ru;

³ФГБНУ Агрофизический научно-исследовательский
институт,
195220 Россия, г. Санкт-Петербург, Гражданский просп., 14,
e-mail: alle007@mail.ru, yuv_chesnokov@agrophys.ru ✉

Поступила в редакцию
22 января 2019 года

QTL MAPPING OF ESTERASE ISOZYME FORMS IN *Brassica rapa* L. MATURE SEEDS

A.S. Rudakova¹, S.V. Rudakov¹, A.M. Artemyeva², D.A. Fateev², N.V. Kocherina³,
Yu.V. Chesnokov³

¹Moldova State University, Republic of Moldova, MD-2009, Chişinău, Mateevich str., 60, e-mail rud-as@mail.ru, rudacov@yahoo.com;

²Federal Research Center Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 42-44, ul. Bol'shaya Morskaya, St. Petersburg, 190000 Russia, e-mail furriongo@gmail.com, akme11@yandex.ru;

³Agrophysical Research Institute, 14, Grazhdanskiy prosp., St. Petersburg, 195220 Russia, e-mail alle007@mail.ru, yuv_chesnokov@agrophys.ru (✉ corresponding author),
ORCID:

Rudakova A.S. orcid.org/0000-0001-9638-2151

Rudakov S.V. orcid.org/0000-0003-2591-6114

Artemyeva A.M. orcid.org/0000-0002-6551-5203

The authors declare no conflict of interests

Received January 22, 2019

Fateev D.A. orcid.org/0000-0002-1075-6704

Kocherina N.V. orcid.org/0000-0002-8791-1899

Chesnokov Yu.V. orcid.org/0000-0002-1134-0292

doi: 10.15389/agrobiol.2019.3.469eng

Abstract

Since the 1960s, isoenzymes have been well known as one of the most common biochemical markers. Establishing the overall variability of the isoenzyme systems and identifying their genetic control retain their relevance, allowing researchers to reveal the fine mechanisms of the relationship of the organism with the environment and homeostasis and to develop effective biochemical markers for rapid assessment of genetically and selectively significant material. In this paper, the chromosome loci responsible for the activity of 13 different esterase forms of mature seeds in *Brassica rapa* L. were identified and mapped for the first time. The doubled haploid lines of two mapping populations, DH30 and DH38, were studied. All identified esterase isoforms were divided into three groups according to their electrophoretic mobility. The group of isoforms A1-A3 had a high molecular weight and low electrophoretic mobility. The group of B1-B7 isoforms exhibited an average molecular weight and an average electrophoretic mobility. The C1-C3 group consisted of isoforms having a low molecular weight and, consequently, the highest electrophoretic mobility. Each of the parental forms, as well as each of the studied lines of mapping populations, had its own unique electrophoretic spectrum of esterase isoforms. Based on the electrophoretic data obtained for both populations, a QTL analysis was carried out and chromosome loci were identified, determining the manifestation of each esterase isoform identified in the mapping lines of populations DH30 and DH38. The composite interval mapping approach, combined with a permutation test (1000 iteration) and a confidence level of $p < 0.05$, allowed us to identify and locate QTLs on chromosomes that determine the manifestation of all esterase isoforms identified by gel electrophoresis, with the exception of A1 isoform for the DH38 population and B7 isoform for the DH30 population. For these two isoforms, no QTL analysis results were obtained because of limitation in initial data on these isoforms in the corresponding mapping population. A total of 35 QTLs for esterase isoforms were mapped for DH30 mapping population and 39 QTLs for DH38 population. As a result of the QTL analysis, molecular markers genetically linked to the identified loci and the percentage of phenotypic variability determined by each of the identified QTLs were also identified. According to isoenzyme analysis, the heterozygosity of both populations in each H_I locus and total heterozygosity H_{total} , as well as $Var(H_I)$ heterozygosity dispersions for one locus and the variance of average heterozygosity within each population $Var(H_{total})$ were calculated. The identified heterozygosity was considered as the average portion of loci with two different alleles in one locus in one individual and could be defined as the observed heterozygosity characterizing the part of the genes for which the studied population is heterozygous. It was shown that in the studied populations of doubled QTL haploid lines, which determine the complex of esterases isoenzymes, are found mainly in the 2nd, 4th, 6th, and 9th linkage groups and form blocks of co-adapted genes and genomic co-adapted gene blocks, which emphasizes the importance of the contribution of these loci in the ontogenesis and adaptability of plants *B. rapa*. In general, the carried out molecular genetic mapping and biochemical analysis of the studied biochemical traits of various manifestation of esterase isoforms in mature seeds of *B. rapa* revealed genetic determinants of the studied characters, as well as the genome distribution of mapped QTLs, which in the long term makes it possible to conduct effective molecular and genetic screening of collection accessions and breeding material of the *B. rapa* species according to these biochemical characters when performing genetic and selection investigations in this species.

Keywords: *Brassica rapa* L., biochemical analysis, esterase isoforms, mature seeds, QTL mapping, population heterozygosity.