

УДК 635.127:581.19

QTL АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ КАЧЕСТВА У *BRASSICA RAPA* L.



Артемяева А.М. – кандидат с.-х. наук,
зав. отделом генетических ресурсов овощных и бахчевых культур

Соловьева А.Е. – кандидат биол. наук, с.н.с.

Кочерина Н.В. – кандидат биол. наук, с.н.с.

Чесноков Ю.В. – доктор биол. наук., зав. лабораторией молекулярной и экологической генетики

ГНУ Всероссийский НИИ растениеводства им. Н.И.Вавилова Россельхозакадемии

190000 г. Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д.44

E-mails: akme11@yandex.ru; yuriy@vir.nw.ru

С использованием двух картирующих популяций линий двойных гаплоидов *Brassica rapa* (DN30, получена скрещиванием корнеплодной репы и масличного желтого сарсона и DN38, получена скрещиванием листовой/черешковой капусты китайской и желтого сарсона) был проведен QTL (quantitative trait loci) анализ пяти биохимических признаков качества. Для каждого изученного признака впервые в России установлены QTL, эффекты действия выявленных QTL, доли фенотипической изменчивости, определяемой каждым QTL, и молекулярные маркеры, генетически сцепленные с идентифицированными QTL. Найденные молекулярные маркеры могут служить эффективным инструментом при массовом скрининге образцов коллекции и селекционного материала по биохимическим признакам качества.

Ключевые слова: *Brassica rapa* L., биохимические признаки качества, QTL, генетическое картирование

Brassica rapa L. – представитель сложного и многогранного рода *Brassica* – включает не только важные сельскохозяйственные культуры, но и является уникальным модельным объектом для генетических и молекулярных исследований у высших растений. Его уникальность определяется тем, что в состав *B. rapa* входят масличные, овощные и кормовые культуры, играющие исключительную роль в мировой экономике и являющиеся источником

ценных питательных и биологически активных веществ. Особенность химического состава культур рода *Brassica* – высокое содержание воды и низкое жиров – обуславливает низкую калорийность капустных растений. Они отличаются относительно высоким содержанием углеводов и белков, включающих девять незаменимых аминокислот.

Овощные растения рода – богатый источник минеральных элементов, прежде всего, калия и кальция,

а также серы, фосфора, цинка, железа, марганца. Они выделяются высоким содержанием биологически активных веществ – ферментов, пигментов, витаминов, а также вторичных метаболитов, которые проявляют антиканцерогенное, антиоксидантное и противовоспалительное действие, стимулируют иммунную систему, препятствуют развитию сердечнососудистых болезней и расстройств, связанных с возрастом.

Изменчивость биохимического состава в пределах вида *B. rapa* очень велика (предшествующие исследования, а также см. Соловьева, Артемьева, 1999, 2004, 2005, 2006а,б, 2010). В последние годы установлены особенности накопления основных элементов биохимического состава и биологически активных веществ ранее мало изученными в ВИР восточноазиатскими капустными культурами вида *B. rapa*, в том числе отдельными их сортовыми типами (Артемьева, 2001, 2004). В то же время, к сегодняшнему дню накоплена лишь ограниченная информация о генетических детерминантах, определяющих проявление хозяйственно ценных биохимических признаков качества и их наследование у *B. rapa*. Одним из методов, позволяющих осуществлять идентификацию генетических детерминант, определяющих проявление количественных, в том числе биохимических, хозяйственно ценных признаков, является метод молекулярно-генетического картирования.

Метод молекулярно-генетического картирования (linkage mapping) позволяет определить относительные позиции ДНК-маркеров на группах сцепления. Картирование хромосомных локусов осуществляется через поиск взаимосвязей молекулярных маркеров с признаками и описывает параллельную генотипическую и фенотипическую изменчивость в картирующих популяциях. Методически идентификация и картирование осуществляется с помощью QTL (Quantitative Trait Loci – локусы количественных признаков) анализа специально созданных двуродительских расщепляющихся популяций (Чесноков, 2009).

Целью данной работы было проведение биохимического и QTL анализов и выявление молекулярных маркеров, генетически сцеп-

ленных с QTL, определяющих проявление биохимических признаков качества у линий двойных гаплоидов картирующих популяций *Brassica rapa* L.

Материалы и методы

Материалом исследований для QTL анализа служили две картирующие популяции: DH38, полученная от скрещивания листовой/черешковой китайской капусты (PC-175, сорт Nai Bai Cai) и масличного желтого сарсона (YS-143, к-FIL500 – 60 линий), и DH30, полученная гибридизацией японской корнеплодной репы (VT-115, сорт Kaigyoku Nakata) и желтого сарсона (40 линий). Исходные для создания популяций образцы принадлежат к различным ботаническим подвидам, имеют различные продуктивные органы; генетическая дистанция между ними велика (Zhao et al., 2005). Популяции созданы в лаборатории селекции растений Университета Вагенингена, Нидерланды (WUR – Wageningen University and Research Centre) при использовании культуры микроспор; потомство дигаплоидных растений от единственного растения F₁ в каждой комбинации скрещивания было использовано для генотипирования и фенотипирования. Линии DH30 и DH38 генотипированы с использованием 299 и 294 AFLP и SSR маркеров соответственно (Lou et al., 2007, 2008). Гомозиготные линии выращивали в Пушкинском филиале ВИР в тепличных и полевых условиях. Биохимический анализ линий по признакам содержания общего белка, аскорбиновой кислоты, β-каротина, хлорофиллов а и b проводили по общепринятым методикам (Ермаков и др., 1972).

Для расчета уровня значимости р использовали программу SYSTAT 13. QTL анализ, установление присутствия и расположение (кандидатов) QTL в группах сцепления (интервал картирования 5 cM), значе-

ния LOD (P=0,05) и степени варьирования признаков (% Expl.), которые объясняются данным QTL, для каждого признака и популяции, проводили с использованием компьютерной программы MAPQTL 6.0 (Van Ooijen, 2009). Значимость каждого LOD устанавливали тестом пермутации (1000 повторений) (Кочерина и др., 2011).

Результаты и обсуждение

В результате проведенных исследований нами выявлены QTL, контролируемые одновременно изученные биохимические признаки (табл.). Так, в популяции DH30 были выявлены QTL, контролируемые содержание β-каротина (варьирование LOD в зависимости от условий выращивания 0,39-1,08), аскорбиновой кислоты (0,94-1,70), хлорофилла а (0,87-1,32), хлорофилла b (0,89-1,55), белка (0,56-1,17). Локусы, контролируемые все изученные биохимические признаки, имели относительно низкие значения LOD и находились преимущественно в третьей, пятой, седьмой и в девятой группах сцепления. Отдельные QTL отмечались также в шестой хромосоме.

В популяции DH38 локусы, оказывавшие влияние на проявление анализируемых биохимических признаков, находились в пятой и десятой группах сцепления. Следует отметить, что QTL, связанные с содержанием β-каротина, проявили свое действие при варьировании LOD от 0,72 до 1,12. QTL признаков содержания аскорбиновой кислоты и содержания хлорофилла а располагались в десятой хромосоме и проявляли LOD 0,62 и 1,21, соответственно. В то же время, QTL, связанный с признаком содержания хлорофилла b (LOD – 0,65) был обнаружен в пятой группе сцепления. Таким образом, у обеих картирующих популяций идентифицированы и локализованы хромосомные локусы, контролируемые пять био-

Картирование QTL биохимических признаков качества

DH30: QTL признака содержания β -каротина				
Группа сцепления*	Позиция	Локус	LOD	% Expl.
R03	73.545	BRMS043R03	0.39	5.9
R06	25.197	KS51082	1,08	26.7
R07	64.409	SSR89	0.97	13.0
DH38: QTL признака содержания β -каротина				
R05	10.665	BRMS034R05	0.72	7.1
R10	17.427	FLC1	1.12	10.8
DH30: QTL признака содержания аскорбиновой кислоты				
R03	73.545	BRMS043R03	1.57	21.4
R03	91.619	KS50200	1,34	32.0
R03	107.893	BRMS008R03	0.94	13.4
R05	34.851	BRMS034R05	1.10	14.7
R07	64.409	SSR89	1,70	38.7
DH38: QTL признака содержания аскорбиновой кислоты				
R10	17.427	FLC1	0.62	6.2
DH30: QTL признака содержания хлорофилла a				
R05	32.544	BRMS007R05	0.87	11.7
R07	64.409	SSR89	1.19	15.8
R09	46.160	BRMS051R09	1,32	48.7
DH38: QTL признака содержания хлорофилла a				
R10	17.427	FLC1	1.21	11.7
DH30: QTL признака содержания хлорофилла b				
R05	32.544	BRMS007R05	0.89	12.0
R07	42.400	BRMS040R07	1.00	13.4
R09	46.160	BRMS051R09	1,55	36.0
R09	51.844	OI10D08O9	0.81	11.0
DH38: QTL признака содержания хлорофилла b				
R05	10.665	BRMS034R05	0.65	8.9
DH30: QTL признака содержания белка				
R03	107.893	BRMS008R03	0.56	8.2
R06	25.197	KS51082	1.17	15.5
R09+	51.519	OI10D08O9	0.81	11.0

* - знак "+" означает наличие аддитивного эффекта у данного QTL.

химических признаков (табл.), определяющих качество у *B. rapa* L.

Обращает на себя внимание относительно низкая LOD-оценка для некоторых выявленных QTL. Согласно данным литературы, LOD-оценку ниже 3-х зачастую относят к низкому уровню достоверности вследствие многократности тестирования при QTL-анализе (Lander, Botstein, 1989). По сути, LOD-оценка представляет собой установление десятичного логарифма вероятности того, что нуль-гипотеза, утверждающая, что между двумя классами рекомбинантных линий, несущих отцовский (AA) и материнский (aa) аллели, нет достоверных фенотипических различий, неверна. Так, LOD = 2 означает, что гипотеза, альтернативная нулевой, вероятнее в 10^2 раз, LOD = 3 – в 10^3 раз и т.д. В то же время, нами было показано (Кочерина и др., 2011), что при высоких LOD-значениях 1/A близка к ошибке I рода и, наоборот, при низких LOD-зна-

чениях ошибка стабильно меньше 1/A, что свидетельствует о достаточной консервативности LOD-оценки. В этом случае критическое значение 3 будет соответствовать максимальной величине ошибки I рода (при $p < 0,001$), и, если выбрана очень высокая частная (индивидуальная) ошибка I рода, например 5 %, то высокий уровень сцепления будет достоверно найден случайным образом (Кочерина и др., 2011). При этом, как показывают полученные нами и другими исследователями данные (Börner et al., 2002; Чесноков и др., 2013), и основные, и минорные QTL часто локализуются в одних и тех же позициях в разных экспериментах и даже в разные годы опытов, поэтому LOD-оценка ниже 3-х также может приниматься во внимание.

Для исследованных биохимических признаков были выявлены генетически сцепленные с ними молекулярные маркеры. С высоким уров-

нем значимости $p \geq 0,001-0,049$ выделенные маркеры оказались связаны с признаками высокого содержания β -каротина, суммы хлорофиллов и низкого содержания белка.

Следует отметить, что использование маркированных линий двойных гаплоидов для поиска ассоциаций молекулярных маркеров с биохимическими признаками качества позволяет устанавливать молекулярные маркеры, достоверно сцепленные с изученными нами признаками высокого содержания аскорбиновой кислоты, β -каротина, хлорофиллов а и b и низкого содержания белка у *B. rapa* L. Можно предположить, что найденные молекулярные маркеры могут служить эффективным инструментом при массовом скрининге образцов коллекции и селекционного материала по биохимическим признакам качества.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта РФФИ №13-04-00128.

Литература

1. Артемьева А.М. Экологическая дифференциация капусты пекинской *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson. // Генетические коллекции овощных растений. СПб. -2001. -Ч.3. - С. 148-166.
2. Артемьева А.М. Доноры и источники для селекции листовых овощных культур вида *Brassica rapa* L. (Пекинская, китайская и японская капусты, листовая репа) // Каталог мировой коллекции ВИР. СПб. -2004. – Вып. 740. -132 с.
3. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Иконникова М.И., Ярош Н.П., Луковникова Г.А. Методы биохимического исследования растений. Л. – 1972. – 430 с.
4. Кочерина Н.В., Артемьева А.М., Чесноков Ю.В. Использование лод-оценки в картировании локусов количественных признаков у растений // Доклады Россельхозакадемии. – 2011. -№3. - С.14-17.
5. Соловьева А.Е., Артемьева А.М. Биохимические исследования восточно-азиатских листовых овощных растений рода *Brassica* L. // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции 1999. -Т. 157. – С. 142-148.
6. Соловьева А.Е., Артемьева А.М. Капустные растения рода *Brassica* L. (Характеристика образцов по основным биохимическим показателям качества) // Каталог мировой коллекции ВИР. СПб. – 2004. -Вып. 756. - 53 с.
7. Соловьева А.Е., Артемьева А.М. Биологически активные вещества капустных растений рода *Brassica* L. // Аграрная Россия. – 2006а. -№ 6. – С. 52-56.
8. Соловьева А.Е., Артемьева А.М. Качественная оценка некоторых восточноазиатских культурных типов вида *Brassica rapa* L. // Аграрная Россия. – 2006б. - № 6. – С. 56-60.

9. Соловьева А.Е., Артемьева А.М. Особенности биохимического состава гибридов листовых овощных культур вида *Brassica rapa* L. // Аграрная Россия. -2010. - №3. -С.17-20
10. Чесноков Ю.В. Картирование локусов количественных признаков у растений. СПб: ВИР. -2009. -100 с.
11. Чесноков Ю.В., Ситников М.Н., Шумлянская Н.В., Кочерина Н.В., Гончарова Э.А., Козленко Л.В., Сюков В.В., Кочетков Д.В., Ловассер У., Бёрнер А. Рекомбинантные инбредные линии картирующей популяции ИТМ1 яровой мягкой пшеницы *Triticum aestivum* L. (эколого-географические испытания и картирование QTL) // Каталог мировой коллекции ВИР. СПб.: ВИР. -2013.- Вып. 813.- 68 с.
12. Börner A., Schumann E., Fürste A., Göster H., Leithold B., Röder M.S., Weber W.E. Mapping of quantitative trait loci determining agronomic important characters in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.)// Theor. Appl. Genet. – 2002. - V.105. -P. 921-936.
13. Lou P., Zhao J., Kim J.S., Shen S., Pino Del Carpio D., Song X. Quantitative trait loci for flowering time and morphological traits in multiple populations of *Brassica rapa* // J. Exp. Bot. 2007. – 58: 4005-4016.
14. Lou P., Zhao J., He H., Hanhart C., Pino Del Carpio D., Verkerk R., Custers J., Koornneef M., Bonnema G. Quantitative trait loci for glucosinolate accumulation in *Brassica rapa* leaves // New Phytologist. – 2008. – V. 179. – P. 1017-1032.
15. Van Ooijen J.W. MapQTL 6. Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations of diploid species. Wageningen, Netherlands, 2009. – 60 p.
16. Zhao J., Wang X., Deng B., Lou P., Wu J., Sun R., Xu Z., Vromans J., Koornneef M., Bonnema G. Genetic relationships within *Brassica rapa* as inferred from AFLP fingerprints // Theor. Appl. Genet. – 2005. -V. 110. -P. 1301-1314.