

CZU: 577.15:581.48:633.844

## ОЦЕНКА ЭСТЕРАЗНОГО ПОЛИМОРФИЗМА В ЗРЕЛЫХ СЕМЕНАХ СУРЕПИЦЫ (*Brassica campestris* L.)

*Анжела РУДАКОВА, Сергей РУДАКОВ, Анна АРТЕМЬЕВА\*, Юрий ЧЕШОКОВ\*\**

*Молдавский государственный университет*

*\*ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, С.-Петербург, Россия*

*\*\*ФГБНУ Агрофизический научно-исследовательский институт, С.-Петербург, Россия*

În scopul studierii enzimelor de esterază în semințele plantelor mature din *Brassica campestris* L. au fost studiate 30 de mostre de varietăți și subspecii din colecția VIR (St. Petersburg).

Folosind metoda electroforezei native cu prelucrarea ulterioară a gelurilor cu soluție specifică substraturilor esterazelor, au fost detectate 10 benzi de izoenzime, ale căror mase moleculare au fost cuprinse între 42 și 15 kD. Cinci dintre aceste izoenzime, având masa moleculară mai mare (42,0-32,4 kD) și desemnate de noi ca benzi ale locusului "b", au fost monomorfe, adică caracteristice pentru toate probele.

Cele cinci benzi de esterază rămase au format locusul "c" și au o masă moleculară mai mică (25,6 kD -15,0 kD). Acest locus s-a distins prin cel mai mare polimorfism dintre toate probele studiate.

S-a constatat că prin compoziția sa de esterază, reprezentanții studiați au fost divizați în 8 zimotipuri, dintre care zimotipul nr.1 este cel mai extins (50% din probe aparțin acestui grup). Zimotipul grupului 2 a reprezentat 16,7% din genotipuri. Numărul maxim de esteraze (câte 9 benzi) este caracteristic pentru 2 zimotipuri - nr. 3 și nr. 4. Cel mai mic număr de esteraze (6 zone) s-a observat la zimotipurile nr. 7 și nr.8.

Frecvența de apariție a fiecărei zone polimorfe a locusului "c" a variat de la 6,7 la 96,7%. Cea mai frecventă dintre toate zonele polimorfe de esteraze a fost zona c3 (Mr 20,9 kD), frecvența de apariție a acesteia fiind de 96,7% din numărul total de genotipuri.

Conținutul cantitativ al formelor individuale de esteraze în probe variază foarte mult. Esteraza locusului "b" se conține în semințe în cantități mai mari comparativ cu benzile locusului "c". Valoarea medie a conținutului tuturor izoenzimelor locusului "b" variază de la 11,8 (banda b5) la 23,5% (banda b4), în timp ce pentru enzimele locusului "c" această valoare se modifică de la 2,2% (banda c1) la 7,1% (banda c3).

**Cuvinte-cheie:** esteraze, izoenzime, electroforeză, zimotip, variabilitate genetică, locus, *Brassica campestris*.

### **EVALUATION OF ESTERASE POLYMORPHISM IN MATURE SEEDS OF COLESEED (*Brassica campestris* L.)**

To study the polymorphism by esterase composition 30 samples of mature seeds of various varieties and subspecies *Brassica campestris* L. from the VIR collection (St. Petersburg) were examined.

The method of native electrophoresis in PAAG with the subsequent processing of the gels revealed 10 main zones of esterase enzymes, which were subdivided into 2 conditional loci – "b" and "c". Five zones of higher molecular weight (42,0 kD – 32,4 kD) were designated as b1–b5. All of them turned out to be monomorphic, i.e. characteristic of all samples. The "c" locus was represented by five lower molecular weight zones (25,6 kD -15,0 kD), which were designated as c1–c5. These zones were characterized by the highest polymorphism among the samples presented.

According to their esterase complex, all samples were divided into 8 groups (zymotypes). The most common was the zymotype 1 (50% of the total number of genotypes). The second most common was zymotype 2, its representatives accounted for 16,7%. The maximum number of esterase enzymes (9 zones) were characterized by the zymotype 3 and 4. The zymotypes 7 and 8 have the smallest number of esterases (6 zones).

The frequency of occurrence of each zone among all genotypes varied from 6,7% to 96,7%. The most common among all polymorphic esterase zones was the zone c3 (Mr 20,9 kD), the frequency of its occurrence was 96,7% of the total number of genotypes.

The relative amount of different isoforms of esterase enzymes in samples varies significantly. The average statistical value of the content of all isoenzymes of locus "b" varies from 11,8% (zone b5) to 23,5% (zone b4), while for enzymes of the locus "c" this value varies from 2,2% (zone c1) to 7,1% (zone c3).

**Keywords:** esterases, isozymes, electrophoresis, zymotype, genetic variability, locus, *Brassica campestris*.

### **Введение**

Знание общей степени вариабильности в ферментативной системе является основополагающим для ее использования в популяционных и генетических исследованиях [1].

Ряд электрофоретических и биохимических методов, описанных для обнаружения скрытой изменчивости, были применены к популяции животных [2,3]. Скрытая изменчивость в растениях была изучена в некоторых ферментных системах в *Avena barbata*, *Hordeum vulgare* и *Zea mays* [4] и в *Oryza ssp.* [5].

Эстеразы, гидролизуя эфиры, обладают обычно очень низкой субстратной специфичностью. Эстеразные системы, как выявлено с помощью электрофоретических методов, характеризуются наличием большого количества изоформ и большой вариабильностью среди отдельных образцов и популяций [6].

Основной нашей задачей было выявление степени полиморфизма среди эстераз зрелых семян 30 образцов сурепицы *Brassica campestris L.* из генетической коллекции ВИРа (г.С.-Петербург) для последующего отбора возможных родительских пар.

### Материалы и методы

Материалом исследования служили зрелые семена 30 разновидностей и подвидов сурепицы (*Brassica campestris L.*) из генетической коллекции ВИРа (г.Санкт-Петербург) (Табл.1).

Семена растений размалывали в фарфоровой ступке до получения муки, затем проводили обезжиривание муки гексаном. По окончании обезжиривания гексан удаляли высушиванием под тягой. В дальнейшем обезжиренный и высушенный растительный материал взвешивали на аналитических весах и проводили экстракцию 0,05 М трис-НСl буфером при рН 8,3 в присутствии ME (2 мкл/мл), ЭДТА (0,5 мМ). Соотношение мука:буфер составляло 1:4, экстракция ферментов проходила при температуре 8°C в течение 12-16 часов. Далее образцы центрифугировали 10 минут при 15 об/мин, отбирали надосадочную жидкость и измеряли содержание белка по методу связывания с красителем Bradford [7], а затем пробы замораживали при -20°C для предотвращения инактивации ферментов. Перед внесением в электрофоретическую камеру образцы медленно размораживали. Изоферменты разделяли методом нативного вертикального электрофореза в ПААГе [8]. Концентрации разделяющего и концентрирующего гелей составляли 11% и 5%, соответственно. Электрофорез проводили в камере Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA), Protein Ladder (Thermo Scientific, USA) на холоде (4-8°C), при напряжении 60-80 В в течение 2,5 часа. В качестве маркеров молекулярных масс использовали Prestained.

Таблица 1

### Список изученных образцов семян стержневой коллекции *Brassica campestris L.* из коллекции ВИРа

|     | № ВИР   | Название образца         | Подвид/форма                                       | Русское название          | Страна    |
|-----|---------|--------------------------|--|---------------------------|-----------|
| 1.  | VIR -1  | Kun Min ai U-zai         | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger f. <i>annua</i> | сурепица яровая           | Китай     |
| 2.  | VIR-2   | Hue Zin U-zai            | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger f. <i>annua</i> | сурепица яровая           | Китай     |
| 3.  | VIR-11  | Gute                     | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger f. <i>annua</i> | сурепица яровая           | Финляндия |
| 4.  | VIR-13  | Местный                  | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger f. <i>annua</i> | сурепица яровая           | Аргентина |
| 5.  | VIR-25  | Zsjan Su U uan-uzai 5082 | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger f. <i>annua</i> | сурепица яровая           | Китай     |
| 6.  | VIR-53  | Local toria              | ssp. <i>dichotoma</i> (Roxb.) Hanelt               | коричневый сарсон и тория | Индия     |
| 7.  | VIR-63  | Pahsi                    | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger f. <i>annua</i> | сурепица яровая           | Индия     |
| 8.  | VIR-68  | Local                    | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger f. <i>annua</i> | сурепица яровая           | Индия     |
| 9.  | VIR-100 | Local                    | ssp. <i>dichotoma</i> (Roxb.) Hanelt               | коричневый сарсон и тория | Непал     |
| 10. | VIR-106 | Lotni mustard            | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger f. <i>annua</i> | сурепица яровая           | Индия     |

|     |         |                        |   |                              |          |
|-----|---------|------------------------|---|------------------------------|----------|
| 11. | VIR-108 | Arlo                   | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger<br>f. <i>annua</i>   | сурепица<br>яровая           | Швеция   |
| 12. | VIR-114 | Local<br>(tetraploid)  | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger<br>f. <i>annua</i>   | сурепица<br>яровая           | Пакистан |
| 13. | VIR-131 | Type 1                 | ssp. <i>trilocularis</i> (Roxb.)<br>Hanelt              | желтый<br>сарсон             | Индия    |
| 14. | VIR-135 | Ds 17                  | ssp. <i>dichotoma</i> (Roxb.)<br>Hanelt                 | коричневый<br>сарсон и тория | Индия    |
| 15. | VIR-161 | Toria selection        | ssp. <i>dichotoma</i> (Roxb.)<br>Hanelt                 | коричневый<br>сарсон и тория | Пакистан |
| 16. | VIR-163 | LGL                    | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger<br>f. <i>annua</i>   | сурепица<br>яровая           | Пакистан |
| 17. | VIR-166 | Root mustard           | ssp. <i>oleifera</i> (DC.)<br>Metzger f. <i>biennis</i> | сурепица<br>озимая           | Тунис    |
| 18. | VIR-176 | V. <i>silvestris</i>   | ssp. <i>silvestris</i> (Lam.)<br>Janchen                | дикая сурепица               | Италия   |
| 19. | VIR-188 | Palton sarson 66       | ssp. <i>trilocularis</i> (Roxb.)<br>Hanelt              | желтый<br>сарсон             | Индия    |
| 20. | VIR-192 | Mustard                | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger<br>f. <i>annua</i>   | сурепица<br>яровая           | Непал    |
| 21. | VIR-205 | Sarson                 | ssp. <i>dichotoma</i> (Roxb.)<br>Hanelt                 | коричневый<br>сарсон и тория | Пакистан |
| 22. | VIR-218 | Nabo <i>silvestris</i> | ssp. <i>silvestris</i> (Lam.)<br>Janchen                | дикая сурепица               | Перу     |
| 23. | VIR-248 | Local                  | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger<br>f. <i>annua</i>   | сурепица<br>яровая           | Испания  |
| 24. | VIR-251 | Vat-cawte              | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger<br>f. <i>annua</i>   | сурепица<br>яровая           | Танзания |
| 25. | VIR-299 | Sangam                 | ssp. <i>trilocularis</i> (Roxb.)<br>Hanelt              | желтый<br>сарсон             | Индия    |
| 26. | VIR-301 | BHLS                   | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger<br>f. <i>annua</i>   | сурепица<br>яровая           | Непал    |
| 27. | VIR-337 | U-zai - zsi            | ssp. <i>oleifera</i> (DC.)<br>Metzger f. <i>biennis</i> | сурепица<br>озимая           | Китай    |
| 28. | VIR-338 | Chen-du-ai-u-zai       | ssp. <i>trilocularis</i> (Roxb.)<br>Hanelt              | желтый<br>сарсон             | Китай    |
| 29. | VIR-339 | Jui –cai- tai          | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger<br>f. <i>annua</i>   | сурепица<br>яровая           | Китай    |
| 30. | VIR-374 | Type 9                 | ssp. <i>oleifera</i> (DC.) Metzger<br>f. <i>annua</i>   | сурепица<br>яровая           | Бутан    |

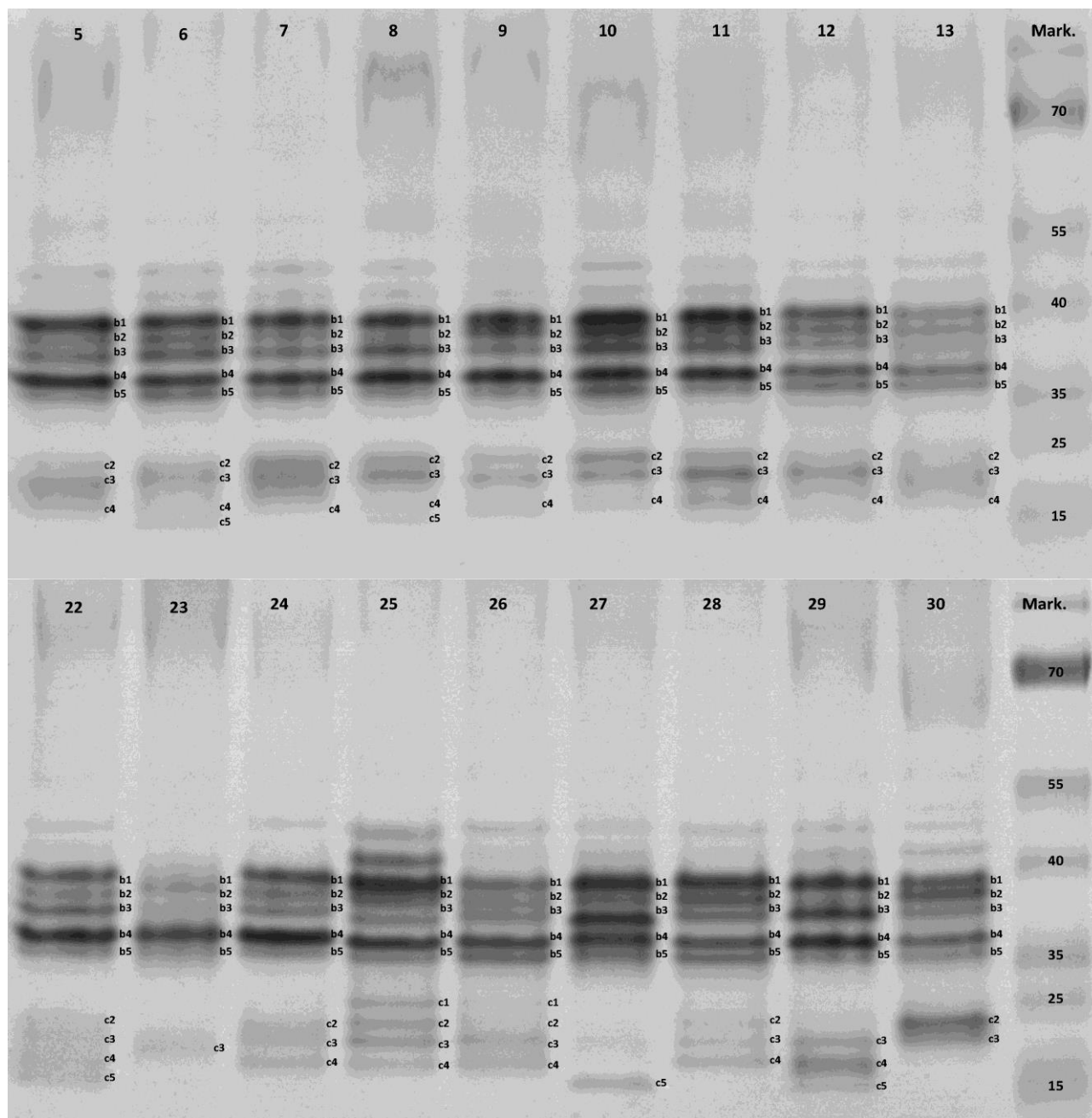
По окончании электрофореза гель выдерживали в специфическом для эстераз реактиве [9]. После появления на геле коричнево-фиолетовых полос, характерных для эстераз, реактив сливали, а избыток красителя отмывали 10% уксусной кислотой.

Полученные зимограммы сканировали на Epson Expression 10000XL сканере (GE Healthcare, USA). Каждый образец (значение Rf всех полос в треке, расчет молекулярных масс по стандартам) оценивали с использованием программы Phoretix 1D Advansed (TotalLab, Ltd., Great Britain).

### Результаты

По данным нативного электрофореза в исследованных семенах 30 генотипов сурепицы *Brassica campestris* L. (ВИР, г. С.-Петербург) было выявлено 10 изоформ эстеразных ферментов с молекулярными массами от 42,0 кД до 15,0 кД (Рис.1).

Все эстеразные формы мы разделили на два условных локуса – «b» и «c», которые отличались как по молекулярным массам, так и по степени вариабильности среди исследованных образцов (Табл.2). Пять зон с более высокой молекулярной массой (42,0 кД – 32,4 кД) были обозначены как b1 – b5. Все пять зон оказались мономорфными, т.е. встречались во всех образцах.



**Рис. 1.** Электрофоретические профили изоформ эстераз у исследованных генотипов сурепицы (№ 5-13), (22-30).

Вдоль трекров проставлены номера присутствующих в образце эстеразных зон, последний трек справа – маркеры молекулярных масс (15 - 70 кД). Цифры сверху – номера образцов в соответствии с каталогом ВИР (Табл.1).

В отличие от зон локуса «b», зоны локуса «c», характеризовались высокой степенью изменчивости. Все пять зон локуса «c», обозначенные как c1 – c5, обладали более низкой молекулярной массой (25,6 кД – 15,0 кД), и частота встречаемости каждой из зон этого локуса сильно варьировала (Табл.2).

По своему эстеразному комплексу все образцы были разделены на 8 зимотипов (групп) (Табл.3).



Таблица 2

## Распределение эстеразных зон среди зимотипов сурепицы

| Зимотип             | b1<br>42,0 | b2<br>40,0 | b3 37,8 | b4 34,3 | b5 32,4 | c1<br>25,6 | c2<br>23,1 | c3<br>20,9 | c4<br>17,9 | c5<br>15,0 | Общее<br>число зон |
|---------------------|------------|------------|---------|---------|---------|------------|------------|------------|------------|------------|--------------------|
| Гр.1                | +          | +          | +       | +       | +       |            | +          | +          | +          |            | 8                  |
| Гр.2                | +          | +          | +       | +       | +       |            |            | +          | +          | +          | 8                  |
| Гр.3                | +          | +          | +       | +       | +       |            | +          | +          | +          | +          | 9                  |
| Гр.4                | +          | +          | +       | +       | +       | +          | +          | +          | +          |            | 9                  |
| Гр.5                | +          | +          | +       | +       | +       |            |            | +          | +          |            | 7                  |
| Гр.6                | +          | +          | +       | +       | +       |            | +          | +          |            |            | 7                  |
| Гр.7                | +          | +          | +       | +       | +       |            |            | +          |            |            | 6                  |
| Гр.8                | +          | +          | +       | +       | +       |            |            |            |            | +          | 6                  |
| Частота<br>зоны (%) | 100        | 100        | 100     | 100     | 100     | 6,7        | 70         | 96,7       | 90         | 30         |                    |

Таблица 3

## Зимотипы семян сурепицы и их эстеразный состав

| Зимотип | Зоны эстераз* | Число зон в<br>зимотипе | Номера генотипов**   | Всего<br>генотипов | %    |
|---------|---------------|-------------------------|----------------------|--------------------|------|
| Гр.1    | b1-b5, c2-c4  | 8                       | 1-5, 7, 9-15, 24, 28 | 15                 | 50   |
| Гр.2    | b1-b5, c3-c5  | 8                       | 16, 18-20, 29        | 5                  | 16,7 |
| Гр.3    | b1-b5, c2-c5  | 9                       | 6, 8, 22             | 3                  | 10   |
| Гр.4    | b1-b5, c1-c4  | 9                       | 25-26                | 2                  | 6,7  |
| Гр.5    | b1-b5, c3-c4  | 7                       | 17, 21               | 2                  | 6,7  |
| Гр.6    | b1-b5, c2-c3  | 7                       | 30                   | 1                  | 3,3  |
| Гр.7    | b1-b5, c3     | 6                       | 23                   | 1                  | 3,3  |
| Гр.8    | b1-b5, c5     | 6                       | 27                   | 1                  | 3,3  |

\* - зоны эстераз даны в соответствии с таблицей 2;

\*\* - номера генотипов даны в соответствии с таблицей 1.

Представители самого распространенного зимотипа группы 1 составили 50% от общего количества генотипов. Вторым по распространенности был зимотип группы 2 – его встречаемость составила 17%. Три образца, принадлежащие разным зимотипам, №30 (гр.6), №23 (гр.7) и №27 (гр.8), обладали уникальным составом эстераз, что связано, вероятно, с происхождением образцов (Испания, Бутан, юг Китая). Частота встречаемости таких эстеразных комплексов чрезвычайно мала (3,3%).

Максимальным количеством эстеразных ферментов (по 9 зон) отличались зимотипы группы 3 (встречаемость – 10%) и группы 4 (6,7%). Зимотипы 1 и 2 обладали одинаковым количеством зон в своих эстеразных комплексах: по 8 изоформ в каждом. Наименьшим количеством эстеразных зон (по 6 зон) отличались зимотипы 7 и 8. По 7 зон в своем эстеразном составе включали зимотип 5 (6,7%) и зимотип 6.

Частота встречаемости каждой из зон среди всех генотипов варьировала от 6,7% до 96,7%, – естественно, это касается только зон полиморфного локуса «с». Самой распространенной среди всех полиморфных эстеразных зон была зона с3 (M<sub>r</sub> 20,9 кД): 96,7% генотипов включали ее в свой эстеразный состав. Зона с4 (M<sub>r</sub> 17,9 кД) присутствовала в эстеразном комплексе 90% генотипов. 70% всех генотипов обладали зоной с2 (M<sub>r</sub> 23,1 кД). Более редкими были зоны с5 (M<sub>r</sub> 15,0 кД) и с1 (M<sub>r</sub> 25,6 кД) с частотой встречаемости, соответственно, 30% и 6,7%.

По результатам денситометрии было получено процентное соотношение всех эстеразных зон, присутствующих в каждом образце. Минимальные и максимальные значения процентного содержания каждой зоны, выявленные среди всех образцов, а также среднестатистическое значение количественного содержания всех зон, представлены в таблице 4.

Таблица 4

## Относительное количество эстеразных изоферментов в семенах сурепицы

| ЗОНЫ                | b1   | b2   | b3   | b4   | b5   | c1   | c2   | c3   | c4   | c5   |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| М <sub>r</sub> (кД) | 42,0 | 40,0 | 37,8 | 34,2 | 32,4 | 25,6 | 23,1 | 20,9 | 17,9 | 15,0 |
| Мин. %              | 11,2 | 8,9  | 9,8  | 16,8 | 7,6  | 1,3  | 2,3  | 3,3  | 2,6  | 0,4  |
| Мах. %              | 25,1 | 16,6 | 20,3 | 30,8 | 17,6 | 3,1  | 14,7 | 11,8 | 8,4  | 4,5  |
| Среднее             | 18,5 | 13,2 | 14,0 | 23,5 | 11,8 | 2,2  | 4,9  | 7,1  | 5,2  | 2,5  |

Как видно из таблицы 4, зоны локуса «b» количественно доминируют над зонами локуса «c», что, очевидно, указывает на их большую значимость в биохимических процессах, происходящих в семенах. Самое высокое процентное содержание было получено для зоны b4 – 30,8%; среди зон локуса «b» наименьший процент был получен для зоны b5 – 7,6%. Для зон локуса «c» максимальное значение имела зона c2 – 14,7%, а минимальное – зона c5 (0,4%). Среднестатистическое значение содержания всех изоферментов локуса «b» варьирует от 11,8% (зона b5) до 23,5% (зона b4), в то время как для ферментов локуса «c» эта величина изменяется от 2,2% (зона c1) до 7,1% (зона c3).

Таким образом, выявленный полиморфизм между образцами семян сурепицы *Brassica campestris* L. по их эстеразному составу может быть использован при проведении как физиолого-биохимических, так и генетико-селекционных исследований.

## Литература:

1. NEVO, E. Plant genetic resources: prediction by isozyme markers and ecology. In: *Isozymes Curr. Top. Biol. Med. Res.*, 1987, vol.16, p.247-267.
2. CHAMBERS, G.K., LOVER, W.G., CAPBELL, S., GIBSON, J.B. Structural analysis of an electrophoretically cryptic alcohol dehydrogenase variant from an Australian population of *Drosophila melanogaster*. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1981, vol.78, p.3103-3107.
3. HEINSTR, P.W.H., ABE, W.J.M., SCHARLOO, W., THORING, G.F.W. Alcohol dehydrogenase of *Drosophila melanogaster*; metabolic differensis mediated through cryptic allozymes. In: *Heredity*, 1986, vol.57, p.23-29.
4. SHUMAKER, K.M., ALLARD, R.W., ALLARD, A.L. Cryptic variability at enzyme loci in three plant species, *Avena barbata*, *Hordeum vulgare* and *Zea mays*. In: *J. Hered.*, 1982, vol.73, p.86-90.
5. SECOND, G. Origin of the genetic diversity of cultivated rice (*Oryza* ssp.) - study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. In: *Jpn. J. Genet.*, 1982, vol.57, nr.1, p.25-57.
6. CUMMINS, I., BURNET, M., EDWARDS, R., Biochemical characterization of esterases active in hydrolyzing xenobiotics in wheat and competing weeds. In: *Physiologia Plantarum*, 2001, vol.113, p.477-485.
7. BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. In: *Anal. Biochem.*, 1976, vol.72, p.248-254.
8. DAVIS, B.J. Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. In: *Annals of the NY Academy of Science*, 1964, vol.121, p.404-427.
9. MEON, S. Protein, esterase and peroxidase patterns of phytophthora isolates from Cocoa in Malaysia. In: *J. Islamic. Acad. Sci.*, 1988, vol.1, nr.2, p.154-158.

## Данные об авторах:

**Ангела РУДАКОВА**, ведущий научный сотрудник, Молдавский государственный университет.

**Сергей РУДАКОВ**, научный сотрудник, Молдавский государственный университет.

**Анна АРТЕМЬЕВА**, ФГБНУ Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, С.-Петербург, Россия.

**Юрий ЧЕСНОКОВ**, ФГБНУ Агрофизический научно-исследовательский институт, С.-Петербург, Россия.

Prezentat la 24.09.2019