

Научная статья

УДК 633.352:581.48:577.112:577.156

DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o2



Протеолитическая деградация белков семян видов вики (*Vicia* L. subgenus *Vicia*) секции *Peregrinae* Kupicha при SDS-электрофорезе и её предотвращение

Ал. В. Конарев¹, Э. Э. Егги², Т. Г. Александрова²

¹Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, Санкт-Петербург, Россия

Автор, ответственный за переписку: Александр Васильевич Конарев, alv-konarev@yandex.ru

Актуальность. SDS-электрофорез белков семян благодаря своей простоте и хорошей воспроизводимости результатов широко используется при изучении генофонда бобовых и других растений, видовой и сортовой идентификации, анализе внутривидовой изменчивости, а также регистрации коллекционного материала. Данные, полученные этим методом, хорошо согласуются с результатами анализа ДНК или служат дополнением к ним. Как правило, белки семян бобовых, включая представителей рода *Vicia* L., подвергнутые SDS-электрофорезу, образуют чёткие информативные спектры. При анализе белков многих образцов семян видов вики секции *Peregrinae* Kupicha при использовании стандартных подходов, разработанных ранее в ВИР и одобренных ISTA (the International Seed Testing Association), не удалось получить чёткие электрофоретические спектры. Это поставило под вопрос применимость стандартных подходов к идентификации видов вики из секции *Peregrinae*. **Задача работы** – выяснение причин деградации белков семян у представителей секции *Peregrinae* и нахождение путей её предотвращения для обеспечения возможности проведения видовой идентификации и регистрации образцов коллекции вики с использованием единого подхода. **Материалы и методы.** Белки семян ряда видов вики *Vicia* L. subgenus *Vicia* из секций *Bithynicae* (B. Fedtsch.) Maxted, *Hypochusa* (Alef.) Aschers. et Graebner, *Microcarinae* Maxted и *Peregrinae* Kupicha были проанализированы методом SDS-электрофореза с использованием стандартного способа экстракции белков из муки с использованием 0,025 М трис-глицинового буфера pH 8,3 при комнатной температуре и его модификаций, включающих нагревание экстракта при 80°C или 100°C с добавлением 2-меркаптоэтанола или без него, а также добавление ингибиторов цистеиновых и сериновых протеаз. **Результаты и их обсуждение.** Анализ белков семян представителей большинства секций подрода *Vicia* обеспечил получение информативных видоспецифичных белковых спектров, тогда как для образцов видов секции *Peregrinae* было характерно формирование спектров, которые свидетельствовали в пользу деградации белков, причем виды этой секции отличались по частоте встречаемости таких спектров. Так, если у семи образцов *V. aintabensis* Boiss & Hausskn. ex Boiss различного географического происхождения, года и места репродукции все семена давали такие спектры, в то время как у *V. peregrina* L. 12 из 13 образцов давали спектры частично или полностью деградированных белков, то у *V. michauxii* Sprengel полноценные спектры были получены для белков семян шести образцов из девяти. Изменение условий выделения белков из муки, а именно замена экстракции с использованием трис-глицинового буфера pH 8,3 при комнатной температуре на экстракцию с применением аналогичного буфера с кратковременным нагреванием при 100°C в присутствии 2-меркаптоэтанола позволило получить полноценные белковые спектры почти у всех проанализированных образцов представителей секции *Peregrinae*. Белковые спектры представителей других секций вики, а также спектр белков сои, используемый в качестве стандарта при видовой идентификации бобовых, в модифицированных условиях не отличались от исходных. **Заключение.** Полученные результаты позволяют предположить, что деградация белков у видов секции *Peregrinae* связана с аномальной активностью эндогенных протеаз семян при стандартных условиях экстракции белков, причем данный признак детерминирован генотипически. Новая модификация метода выделения белков из семян позволяет применять общепринятые подходы, основанные на SDS-электрофорезе, к анализу генофонда видов вики секции *Peregrinae* и других видов *Vicia*.

Ключевые слова: запасные белки, SDS-электрофорез, видовой идентификация, протеазы, протеолиз

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке в рамках государственных заданий согласно тематическим планам ВИР по проекту № FGEM-2022-0002 «Выявление возможностей генофонда бобовых культур для оптимизации их селекции и диверсификации использования в различных отраслях народного хозяйства» и ВИЗР по проекту № FGEU-2022-0004 «Фундаментальные проблемы эффективного управления динамикой численности опасных и особо опасных вредителей полевых культур в условиях выхода страны из экономического кризиса». Часть работы выполнена в рамках проекта «Национальная сетевая коллекция генетических ресурсов растений для эффективного научно-технологического развития РФ в сфере генетических технологий» (Соглашение № 075-15-2021-1050 от 28.09.2021).

Для цитирования: Конарев Ал.В., Егги Э.Э., Александрова Т.Г. Протеолитическая деградация белков семян видов вики (*Vicia* L. subgenus *Vicia*) секции *Peregrinae* Kupicha при SDS-электрофорезе и её предотвращение. *Биотехнология и селекция растений*. 2024;7(3):5-18. DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o2

Прозрачность финансовой деятельности: Авторы не имеют финансовой заинтересованности в представленных материалах или методах. Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы. Мнение журнала нейтрально к изложенным материалам, авторам и их месту работы.

© Конарев Ал.В., Егги Э.Э., Александрова Т.Г., 2024

Original article

DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o2

Proteolytic degradation of seed proteins of vetch species (*Vicia* L. subgenus *Vicia*) of section *Peregrinae* Kupicha during SDS-electrophoresis and its prevention

Alexander V. Konarev¹, Elly E. Eggi², Tatiana G. Aleksandrova²¹All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia²N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

Corresponding author: Alexander V. Konarev, alv-konarev@yandex.ru

Background. Due to its simplicity and good reproducibility, SDS-electrophoresis of seed proteins is widely used for investigating the gene pool of legumes and other plants, for species and varietal identification, analyzing the intraspecific variability, and registering collection material. The data obtained by this method agree well with the DNA analysis results complement them. Typically, legume seed proteins, including representatives of the genus *Vicia* L., show clear informative SDS electrophoretic profiles. When analyzing seed accessions of vetch species of the section *Peregrinae* Kupicha using standard approaches previously developed at VIR and approved by ISTA (the International Seed Testing Association), clear electrophoretic protein profiles could not be obtained for many accessions. This called into question the applicability of standard approaches to identifying vetch species in the section *Peregrinae*. The **objective** of the work was to clarify the nature of seed proteins degradation in representatives of the *Peregrinae* section and to find ways to prevent it to ensure the possibility of carrying out species identification and registration of all accessions in the vetch collection using a unified approach. **Material and methods.** Seed proteins of a number of vetch species *Vicia* L. from sections *Biithynicae* (B. Fedtsch.) Maxted, *Hypechusa* (Alef.) Aschers. et Graebner, *Microcarinae* Maxted and *Peregrinae*, members of the subgenus *Vicia*, were analyzed by SDS-electrophoresis using the standard method of protein extraction from flour with 0.025 M Tris-glycine buffer pH 8.3 at room temperature and its modifications, including heating the extract at 80°C or 100°C with or without the addition of 2-mercaptoethanol, as well as the addition of cysteine and serine protease inhibitors. **Results and discussion.** An analysis of seed proteins of representatives of most sections of the subgenus *Vicia* yielded informative species-specific protein profiles, whereas species of the section *Peregrinae* were characterized by the protein profiles, which indicated protein degradation, and species of this section differed in the frequency of such profile occurrence. While such profiles were obtained for all seeds of seven accessions of *V. aintabensis* Boiss & Hausskn. ex Boiss differing in geographical origin, year and place of reproduction, and 12 out of 13 of *V. peregrina* L. accessions demonstrated profiles of partially or completely degraded proteins, complete seed protein profiles were obtained for six out of nine *V. michauxii* Sprengel accessions. A change in conditions for protein isolation, namely replacement of their extraction from flour with Tris-glycine buffer pH 8.3 at room temperature with extraction in the same buffer by a short-term heating at 100°C in the presence of 2-mercaptoethanol, made it possible to obtain complete protein profiles for all accessions representing the section *Peregrinae*. The protein profiles of representatives of other vetch sections, as well as the profile of soybean proteins used as a standard for legume species identification, did not differ from the original ones under the modified conditions. **Conclusions.** The obtained results suggest that protein degradation in species of the *Peregrinae* section is associated with the abnormal activity of endogenous seed proteases under standard protein extraction conditions, and this trait is determined genotypically. A new modification of the method for isolating proteins from seeds makes it possible to apply the generally accepted approaches based on SDS-electrophoresis in the analysis of the gene pool of the *Peregrinae* section of the subgenus *Vicia*, as well as other vetch species.

Keywords: storage proteins, SDS electrophoresis, species identification, proteases, proteolysis

Acknowledgements: the work was financially supported within the framework of State Assignments according to the thematic plans of VIR, Project No. FGEM-2022-0002 “Identification of the possibilities of legume crop genetic diversity to optimize their breeding and diversify uses in various sectors of the national economy” and VIZR, Project No. FGEU-2022-0004 “Fundamental problems of effective management of the population dynamics of dangerous and especially dangerous pests of field crops in the context of the country’s recovery from the economic crisis”. Part of the work was carried out within the framework of the Project “National Network Collection of Plant Genetic Resources for Effective Scientific and Technological Development of the Russian Federation in the Field of Genetic Technologies”.

For citation: Konarev A.V., Eggi E.E., Aleksandrova T.G. Proteolytic degradation of seed proteins of vetch species (*Vicia* L. subgenus *Vicia*) of section *Peregrinae* Kupicha during SDS-electrophoresis and its prevention. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2024;7(3):5-18. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o2

Financial transparency: The authors have no financial interest in the presented materials or methods. The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work. The journal’s opinion is neutral to the presented materials, the authors, and their employers.

© Konarev A.V., Eggi E.E., Aleksandrova T.G., 2024

Введение

Род *Vicia* L. включает ряд видов, имеющих пищевое и кормовое значение, а также множество диких видов, являющихся существенной частью природных экосистем (Maxted, 1993, 1994; Ali, Osman, 2020; Salehi et al., 2021). Виды вики, как и многие другие бобовые, являются важными источниками белка, богатого незаменимыми аминокислотами, обладающего к тому же ценными для человека биологическими активностями (Kuerban et al., 2020; Tripathy, 2018; Warsame et al., 2018; Dhull et al., 2022; Salehi et al., 2021). Повышение продуктивности и улучшение пищевых и кормовых качеств видов вики, как и других бобовых культур, возможно, в частности, за счет более широкого привлечения в селекцию доноров генов ценных признаков. Важным направлением при работе с генофондом культурных растений является структурирование сведений о нем, включающее выяснение разнообразия, решение вопросов систематики и филогении видов, а также регистрацию коллекционных образцов (Konarev, 2000; Konarev et al., 2019b). В настоящее время при изучении генофонда бобовых, включая виды вики, в дополнение к фенотипической оценке широко применяются методы электрофоретического анализа запасных белков, изоферментов, ингибиторов ферментов (Konarev et al., 2002; Leht, Jaaska, 2019; Ali, Osman, 2020; Bobkov, Bashkirova, 2022), а также кариологии и молекулярной биологии (Caputo et al., 2013; Wu et al., 2021; Bosmali et al., 2022; López-Román et al., 2024). В ВИР при регистрации коллекционного материала, видовой и сортовой идентификации, определении чистоты репродуцированных семян, а также подборе материала в качестве исходного для селекции бобовых (сои, люпина, клевера, козлятника, вики и других) на протяжении многих лет успешно используется SDS-электрофорез запасных белков семян, при котором компоненты спектра белков обозначаются по «соевой шкале», построенной на позициях компонентов стабильного по составу спектра белков культурной сои (*Glycine max* L.) (Tarlakovskaya et al., 1990; Eggi, 2013; Eggi, 2015; Mazin, Eggi, 2021). Разработанные в ВИР подходы были положены в основу методов идентификации и регистрации образцов коллекции видов и сортов бобовых, официально признанных стандартными международной организацией семенного контроля ISTA (the International Seed Testing Association) (Konarev, 2000). Эти методы не потеряли актуальность и с внедрением ДНК-маркеров. Они, в целом, характеризуются простотой, дешевизной и высокой воспроизводимостью результатов, которые, как правило, хорошо согласуются с данными как морфологического анализа, так и анализа ДНК или служат эффективным дополнением к ним (Potokina et al., 2000, 2003; Ali, Osman, 2020). SDS-электрофорез запасных белков семян широко используется в разных странах при решении вопросов разнообразия и таксономических взаимосвязей видов вики (Khalik, Al-Gohary, 2013; Bechkri et al., 2017; Ali, Osman, 2020;

Mirali et al., 2007; El-Badan et al., 2021; Yassen et al., 2022; Hasan, Haddad, 2023), для определения типа опыления для последующих скрещиваний (Tripathy, 2018; Mirali, 2005), для идентификации видов и сортов (Barratt, 1980; Eggi, Aleksandrova, 2022), в том числе, проверки подлинности сортового материала, сортовой аутентичности семян (Eggi, Aleksandrova, 2019), а также при регистрации коллекционных образцов. Установлено, что компонентный состав электрофоретического спектра белков семян вики, как и других бобовых, в подавляющем числе случаев не зависит от места и условий произрастания образцов (Mirali et al., 2007; Khalik, Al-Gohary, 2013), что обеспечивает стабильность результатов и упрощает их интерпретацию. Компонентный состав электрофоретического спектра запасных глобулинов, например, *Vicia faba* L. остается практически неизменным при хранении семян в течение 30 лет при комнатной температуре (Piotrowicz-Cieślak et al., 2020).

В суммарном электрофоретическом спектре белков семян видов рода *Vicia* основными по интенсивности являются компоненты характерных для бобовых запасных глобулинов 11S и 7S – легумина и вицилина соответственно (Warsame et al., 2018; Tripathy et al., 2018; Eggi, Aleksandrova, 2019).

Помимо запасающей роли в качестве источника аминокислот при прорастании или пищевой ценности для человека и животных (Tripathy, 2018; Warsame et al., 2018; Dhull et al., 2022), глобулины семян разных видов вики, как и других бобовых, обладают множеством различных биологических активностей, включая защитную в отношении микроорганизмов (Wong, Ng, 2011) или терапевтическую (Dhull et al., 2022; Kuerban et al., 2020).

Белковый комплекс семян бобовых, визуализируемый в электрофоретическом спектре, формируется при созревании в результате экспрессии ряда структурных генов и многоступенчатой модификации полипептидов сложным набором протеаз (Scholz et al., 1983; Warsame et al., 2018). В этих процессах участвует не менее четырех папаин-подобных и четырех легумаин-подобных цистеиновых протеаз, кодируемых мультигенными семьями (Muntz, 1996; Fischer et al., 2000). Действие протеаз регулируется как уровнем экспрессии генов, так и превращением неактивных зимогенов в активные ферменты в результате процессинга. Частичный протеолиз начинается вскоре после биосинтеза глобулинов в развивающемся семени (Müntz et al., 1996). Вицилин и легумин откладываются в белковых телах в семядолях и зародышевой оси семян вики (Schlereth et al., 2000). В нормальных условиях сформировавшийся белковый комплекс сохраняется неизменным до этапа прорастания семян, на котором полипептиды деградируют в результате последовательной активации компонентов сложного набора протеаз, в основном, цистеиновых (Ribeiro et al., 2004). Часть протеаз образуются еще при созревании и остаются неактивными в белковых телах до прорастания (Müntz et al., 2001). Вначале деградируют глобули-

ны в зародышевой оси и лишь через двое суток в семядолях, при этом первыми разрушаются вицилины (Schlereth et al., 2000). По-видимому, изменение конформации запасных белков при прорастании семян инициирует их деградацию легумин-подобными протеазами (Müntz, Shutov, 2002; Shutov et al., 2012; Kakhovskaya et al., 2019).

SDS-электрофорез белков семян в исполнении разных исследователей показал свою эффективность при анализе разнообразия и филогении большинства представителей основных групп видов – секций – рода *Vicia* (Khalik, Al-Gohary, 2013; El-Badan et al., 2021). К подроду *Vicia* принадлежат экономически значимые виды, в частности *V. faba* и *V. sativa* L. (Maxted, 1994). При проведении работ по регистрации образцов видов *Vicia* subgenus *Vicia* из коллекции ВИР этим методом белки семян большинства образцов видов *V. peregrina* L., *V. aintabensis* Boiss. & Hausskn. и *V. michauxii* Sprengel не дали четких спектров в отличие от белков представителей других видов этого подрода. Это обстоятельство воспрепятствовало осуществлению регистрации образцов трёх видов и поставило вопрос о степени применимости электрофореза для поставленных задач. Известно, что деградация белков покоящихся зрелых семян различных растений может быть вызвана как аномальной активностью эндогенных протеаз, в частности при неблагоприятных погодных условиях до уборки урожая (Dorrian et al., 2023), так и протеазами насекомых-вредителей (Konarev et al., 2019a; Konarev, 2020) или патогенных грибов (Peršić et al., 2023; Zhu et al., 2023).

По данным морфологического, биохимического, кариологического и молекулярного анализов виды *V. peregrina* L., *V. aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss. and *V. michauxii* Sprengel выделяют в секцию *Peregrinae* *Vicia* subgenus *Vicia*. (Maxted, 1994; Frediani et al., 2005; Jaaska, Leht, 2007; Caputo et al., 2013; Bosmali et al., 2022).

Задача работы – попытаться выяснить природу деградации белков семян у представителей секции *Peregrinae* и найти пути её предотвращения для обеспечения возможности проведения видовой идентификации и регистрации образцов многовидовой коллекции вики с использованием единого подхода. В качестве рабочей гипотезы деградацию белковых спектров авторы связали с аномальной активностью протеаз в семенах.

Материалы и методы

В изучении находились 94 образца семян 13 видов вики (*Vicia* L. subgenus *Vicia*, сем. Fabaceae, входящих в секции *Bithynicae* (B. Fedtsch.) Maxted, *Hypechusa* (Alef.) Aschers. et Graebner, *Microcarinae* Maxted и *Peregrinae* из коллекции Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР). Главными объектами изучения были представители видов вики секции *Peregrinae*: 13 образцов *V. peregrina* L., 7 образцов *V. aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss., 9 образцов *V. michauxii* Sprengel.

Образцы поступили в коллекцию из Средиземноморья, Закавказья, Центральной Азии. В SDS-электрофорезе использовались семена образцов коллекции вики, репродуцированные в полевых условиях на опытных станциях (ОС) ВИР – Адлерской (АОС) в Краснодарском крае, Дагестанской (ДОС) рядом с Дербентом, Екатерининской (ЕОС) в Тамбовской области, а также в полевых и тепличных условиях Научно-производственной базы «Павловские и Пушкинские лаборатории ВИР» (НПБ ВИР) в Ленинградской области в период 2010-2023 годов. Семена оригинальных образцов, впервые поступивших в коллекцию ВИР, и семена от их репродукции не имели внешних признаков прорастания или поражения насекомыми или патогенами. Информация об использованном в исследовании семенном материале, совмещенная с полученными результатами, представлена в таблицах 1, 2 в разделе «Результаты и их обсуждение».

Для электрофоретического анализа белки экстрагировали из отдельных семян (5-20 семян на образец) по стандартной методике, принятой в ВИР для регистрации образцов двудольных культур и утвержденной Международной Ассоциацией по Тестированию Семян (ISTA) для анализа образцов гороха (Konarev, 2000). Пять миллиграммов муки семян настаивали в 140 мкл 0,025 М трис-глицинового буфера pH 8,3 в течение 40 мин при комнатной температуре, осадок муки удаляли центрифугированием. Чтобы определить возможную причину деградации белков при их экстракции из муки, приготовленной из семян одних образцов, и отсутствие такой деградации при экстракции белков из муки других образцов навески муки из тех и других семян перед экстракцией смешивали в соотношении 1:4, 1:1 и 4:1.

Для подавления возможной активности протеаз, стандартную методику выделения белков модифицировали и использовали шесть различных вариантов, оставляя неизменным 0,025 М трис-глициновый электродный буфер pH 8,3):

- а) с нагреванием –
 - экстракция из муки с использованием буфера
 - с 5% 2-меркаптоэтанолом на водяной бане при 80°C в течение 15 мин;
 - без 2-меркаптоэтанола на кипящей водяной бане (100°C) в течение 2-5 мин;
 - с 5% 2-меркаптоэтанолом на кипящей водяной бане (100°C) в течение 2-5 мин;
 - б) без нагревания –
 - экстракция из муки с добавлением ингибиторов цистеиновых протеаз
 - 1-10 mM пара-хлормеркурибензоата Na (PCMB-Na)
 - 1-10 mM иодацетамида;
 - экстракция из муки с добавлением ингибитора сериновых протеаз – 1-10 mM фенил метилсульфонил фторида (PMSF).

В случае выделения белков с нагреванием муку заливали предварительно разогретым до требуемой темпе-

ратуры экстрагентом и помещали пробирку на водяную баню.

Электрофорез белков проводили в 12,5% ПААГ в диссоциирующей системе с 0,001% додецилсульфатом натрия (SDS-электрофорез) по Лэммли (Laemmli, 1970). Гели окрашивали красителем Coomassie R-250.

Процедуры электрофореза, обработки гелевых пластин и регистрации спектров подробно описаны для белков двудольных растений на примере семян люпина узколистного (Eggi, 2013). В качестве стандартного использовали спектр белков сои *Glycine max* сорта 'Комсомолка' (номер каталога ВИР к-5950). Компоненты спектра белков обозначали по «соевой шкале» (Eggi, 2013). Электрофоретический анализ проводили в трёх повторностях.

Для выявления возможной протеолитической активности в экстрактах из семян в качестве субстрата использовали желатиновый слой фотопленки (Konarev et al., 1999, 2019a). Белковые экстракты подвергали изо-

электрофокусированию (ИЭФ) в гелях Phast pH 3-9 на аппарате PhastSystem (Amersham Biosciences, Великобритания). На гель накладывали фотопленку Фото-65, смоченную раствором 0,1 М NaH_2PO_4 pH 5,0 с 0,1 М дитиоэритритом (для выявления цистеиновых протеаз) или раствором 0,1 М Na_2HPO_4 pH 8,5 (для выявления сериновых протеаз), и инкубировали «сэндвич» при 37°C в течение часа. О наличии протеаз судили по появлению прозрачных полос на тёмном фоне.

Результаты и их обсуждение

Проведенный анализ белков семян 94 образцов видов вики из четырёх секций подрода *Vicia* методом SDS-электрофореза в абсолютном большинстве случаев позволил получить чёткие белковые спектры, отражающие видовую специфичность и внутривидовую изменчивость образцов и служащие основой для регистрации коллекционного семенного материала (рис. 1, табл. 1).

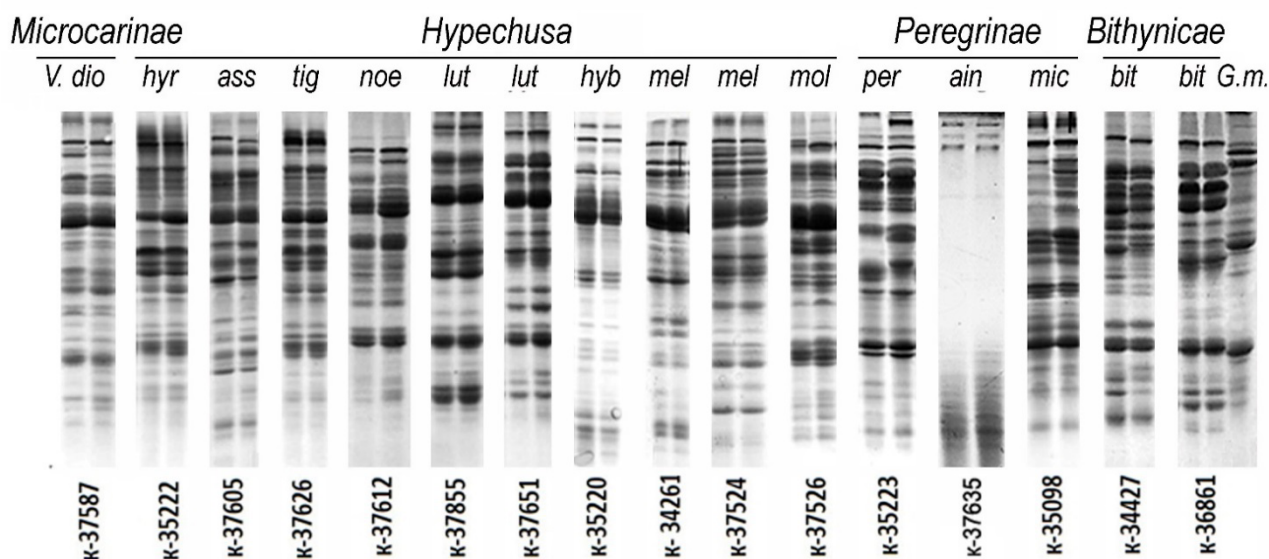


Рис. 1. Спектры белков семян видов вики (*Vicia* L.) – представителей секций *Microcarinae* Maxted, *Hypechusa* (Alef) Asch. & Graebner, *Peregrinae* Kupicha и *Bithynicae* (B. Fedtsch.) Maxted подрода *Vicia*, разделённых методом SDS-электрофореза при стандартных условиях выделения.

Fig. 1. The profiles of seed proteins of vetch species (*Vicia* L.) representing sections *Microcarinae* Maxted, *Hypechusa* (Alef) Asch. & Graebner, *Peregrinae* Kupicha and *Bithynicae* (B. Fedtsch.) Maxted subgenus *Vicia*, separated by SDS-electrophoresis under standard isolation conditions.

V. dio – *Vicia dionysiensis* Mout.; *hyr* – *V. hyrcanica* Fischer & C. Meyer; *ass* – *V. assyriaca* Boiss.; *tig* – *V. tigridis* Mout.; *noe* – *V. noeana* (Reuter in Boiss.) Boiss.; *lut* – *V. lutea* L.; *hyb* – *V. hybrida* L.; *mel* – *V. melanops* Sibth. & Smith; *mol* – *V. mollis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss.; *per* – *V. peregrina* L.; *ain* – *V. aintabensis* Boiss & Hausskn. ex Boiss.; *mic* – *V. michauxii* Sprengel; *bit* – *V. bithynica* L.; *G. m* – соя *Glycine max* (L.) Merr. сорт 'Комсомолка' (к-5950)/ *G. m* – soybean *Glycine max* (L.) Merr. cv. 'Komsomolka' (k-5950).

Таблица 1. Результаты SDS-электрофореза образцов некоторых видов вики из четырёх секций подрода *Vicia* и определение типа (полноценный или «деградированный») спектра белков семян

Table 1. Results of SDS-electrophoresis of accessions of some vetch species from four sections of the subgenus *Vicia* and the determined type (complete or degraded) of seed protein profiles

№ п/п/ No.	Вид/ Species	Секция по/ Section according to Maxted (1993)	Число образцов/ Number of accessions		
			исследованных/ studied	с полноценными спектрами/ with complete profiles	с «деградированными» спектрами/ with degraded profiles
1	<i>Vicia. dionysiensis</i> Mout.	<i>Microcarinae</i> Maxted	1	1	0
2	<i>V. assyriaca</i> Boiss.	<i>Hypochusa</i> (Alef.) Asch. & Graebner	1	1	0
3	<i>V. tigridis</i> Mout.		1	1	0
4	<i>V. hyrcanica</i> Fisch. et C.A. Mey.		20	20	0
5	<i>V. noeana</i> Reut. ex Boiss.		2	2	0
6	<i>V. lutea</i> L.		26	26	0
7	<i>V. hybrida</i> L.		4	4	0
8	<i>V. melanops</i> Sibth. et Smith		2	2	0
9	<i>V. mollis</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss.		1	1	0
10	<i>V. peregrina</i> L.	<i>Peregrinae</i> Kupicha	13	1	12
11	<i>V. aintabensis</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss.		7	0	7
12	<i>V. michauxii</i> Sprengel		9	6	3
13	<i>V. bithynica</i> (L.) L.	<i>Bithynicae</i> (B. Fedtsch. ex Radzhi) Maxted	7	7	0
Итого			94	72	22

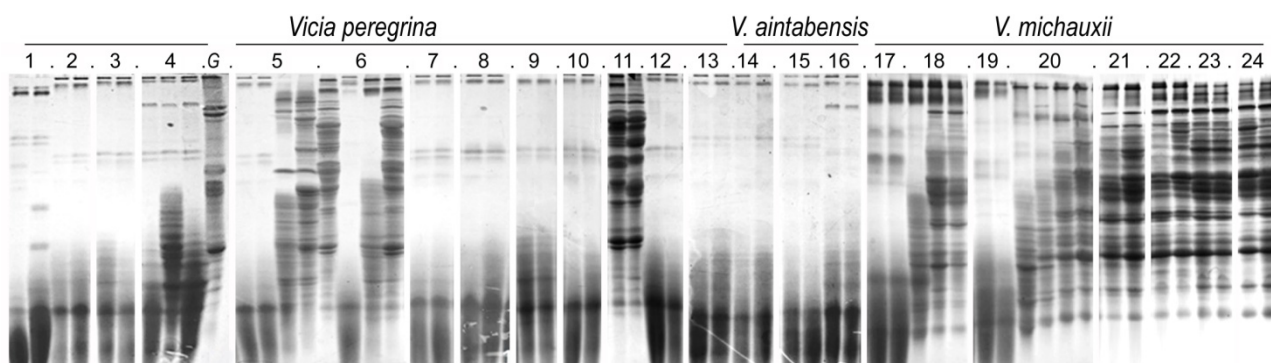


Рис. 2. Электрофоретические спектры белков отдельных семян образцов* видов вики из секции *Peregrinae* Kupicha при стандартных условиях выделения

Дорожки №№ 1-13 – *Vicia peregrina* L., 14-16 – *V. aintabensis* Boiss & Hausskn. ex Boiss, 17-24 – *V. michauxii* Sprengel. G. – соя *Glycine max* (L.) Merr. сорт ‘Комсомолка’ (к-5950).

*Информация о соответствии дорожек образцам видов вики приведена в таблице 2

Fig. 2. Electrophoretic profiles of proteins of individual seeds of accessions* of vetch species from the section *Peregrinae* Kupicha under standard isolation conditions

Lanes №№ 1-13 – *Vicia peregrina* L., 14-16 – *V. aintabensis* Boiss & Hausskn. ex Boiss, 17-24 – *V. michauxii* Sprengel. G. – soybean *Glycine max* (L.) Merr. cv. ‘Komsomolka’ (k-5950).

*Information on the correspondence of lanes to vetch accessions is given in Table 2

Анализ видовой специфичности спектров белков не являлся задачей данной работы и будет приведён в отдельной публикации. Однако, в ходе исследований было обнаружено, что у ряда образцов видов секции *Peregrinae* в стандартных условиях эксперимента белки семян не формируют полноценные спектры электрофоретических компонентов с молекулярной массой в интервале от 14 до 160 кДа, а дают лишь группу низкомолекулярных и преимущественно диффузных компонентов. В последнем случае мы ввели обозначение «деградированный» белковый спектр, например, такой спектр характеризует образец к-37635 *V. aintabensis* (см рис.1). При этом деградируют как компоненты вицилина, так и легумина. Полипептиды этих белков идентифици-

руются в полноценных белковых спектрах различных бобовых, (в том числе видов вики, включая, например, *V. sativa*) как интенсивные компоненты в зонах ~20, ~40 (11S) и ~60 (7S) кДа (Eggi, Aleksandrova, 2019). В связи с обнаруженной деградацией белков семян видов вики секции *Peregrinae* при SDS-электрофорезе был проведён более детальный электрофоретический анализ 29 образцов семян видов *V. peregrina* L., *V. aintabensis* Boiss & Hausskn. ex Boiss, и *V. michauxii* Sprengel различного географического происхождения, репродуцированных в разных регионах России (рис. 2, см. табл. 2). На рис. 2 показаны спектры, характерные для большинства изученных образцов.

Таблица 2. Образцы семян видов вики из секции *Peregrinae* Kupicha *Vicia* L. subgenus *Vicia*, исследованные методом SDS-электрофореза

Table 2. Seed accessions of vetch species from the section *Peregrinae* Kupicha, *Vicia* L. subgenus *Vicia*, studied by SDS-electrophoresis

№/ No.	Вид/ Species	№ по каталогу ВИР/ VIR catalogue No.	Происхождение/ Origin	Репродукция/ Reproduction		№ дорожки на рис. 2/ Lane No. in Fig. 2
				место/place	год/year	
1	<i>Vicia peregrina</i> L.	к-36845	Сирия	АОС ВИР	2019	1
2	<i>V. peregrina</i> L.	к-36769	Армения	АОС ВИР	2017	2
3	<i>V. peregrina</i> L.	к-36771	Азербайджан	АОС ВИР	2017	3
4	<i>V. peregrina</i> L.	к-36065	Грузия	ЕОС ВИР	2021	4
5	<i>V. peregrina</i> L.	к-37887	Узбекистан	АОС ВИР	2020	5
6	<i>V. peregrina</i> L.	к-35385	Кыргызстан	ЕОС ВИР	2021	6
7	<i>V. peregrina</i> L.	к-35190	Туркменистан	АОС ВИР	2017	7
8	<i>V. peregrina</i> L.	к-36766	Таджикистан	ЕОС ВИР	2021	8
9	<i>V. peregrina</i> L.	к-35794	Афганистан	АОС ВИР	2017	9
10	<i>V. peregrina</i> L.	к-35121	Туркменистан	АОС ВИР	2017	10
11	<i>V. peregrina</i> L.	к-35223	Азербайджан	ЕОС ВИР	2021	11
12	<i>V. peregrina</i> L.	к-37713	Армения	АОС ВИР	2020	12
13	<i>V. peregrina</i> L.	к-35196	Грузия	АОС ВИР	2017	13
14	<i>V. aintabensis</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	к-37583	Италия	НПБ ВИР	2022	-
15	<i>V. aintabensis</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	к-37590	Сирия	НПБ ВИР	2023	-
16	<i>V. aintabensis</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	к-37597	Турция	НПБ ВИР	2022	-
17	<i>V. aintabensis</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	к-37637	Турция	ДОС ВИР	2022	14
18	<i>V. aintabensis</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	к-37634	Сирия	ЕОС ВИР	2022	15
19	<i>V. aintabensis</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	к-37635	Сирия	ЕОС ВИР	2022	16
20	<i>V. aintabensis</i> Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	к-37636	Сирия	НПБ ВИР	2016	-
21	<i>V. michauxii</i> Sprengel	к-37862	Сирия	АОС ВИР	2018	17
22	<i>V. michauxii</i> Sprengel	к-37532	Турция	АОС ВИР	2016	18
23	<i>V. michauxii</i> Sprengel	к-37534	Турция	АОС ВИР	2016	19
24	<i>V. michauxii</i> Sprengel	к-36721	Армения	ЕОС ВИР	2021	20
25	<i>V. michauxii</i> Sprengel	к-35113	Узбекистан	АОС ВИР	2017	21
26	<i>V. michauxii</i> Sprengel	к-35098	Узбекистан	ЕОС ВИР	2021	22
27	<i>V. michauxii</i> Sprengel	к-35149	Кыргызстан	ЕОС ВИР	2021	23
28	<i>V. michauxii</i> Sprengel	к-31487	Таджикистан	АОС ВИР	2016	24
29	<i>V. michauxii</i> Sprengel	к-36060	Армения	АОС ВИР	2017	-

В стандартных условиях электрофореза из 13 проанализированных образцов *V. peregrina* семена десяти образцов давали размытые, «деградированные» спектры. Только один образец (к-35223) сформировал полноценные спектры и семена двух образцов (к-35385 и к-37887) дали «переходные» спектры от полноценного до «деградированного», причем частично «деградированные» спектры содержали отдельные четкие компоненты. Большинство компонентов «деградированных» спектров характеризовались значительно более низкой молекулярной массой, по сравнению с компонентами полноценных спектров. Наиболее высокомолекулярные компоненты в большинстве случаев оставались неизменными, за исключением случаев спектров белков отдельных семян образца (№5 к-37887). Заметим, что «деградированные» спектры белков большинства образцов содержали два сходных, четко сформированных высокомолекулярных компонента.

Все семена семи проанализированных образцов вида *V. aintabensis*, происходящих из Италии, Сирии, Турции и репродуцированных в НПБ ВИР, ЕОС ВИР, ДОС ВИР и АОС ВИР в период с 2010 по 2023 год (см. табл. 2) в разных постановках электрофореза дали «деградированные» спектры (некоторые из них – спектры №№14-16 – представлены на рис. 2). Лишь единичные семена образцов к-37590 и к-37597 дали частично «деградированные» спектры (спектры не представлены). В целом, очевидно, что деградация белков у образцов данного вида не зависела от происхождения, а также от места и года репродукции семян.

У третьего представителя секции *Peregrinae* – вида *Vicia michauxii* – все семена у четырех образцов (к-35113, к-35098, к-35149, к-31487 – спектры №№ 21-24) дали полноценные спектры, у двух (к-37862, к-37534 – спектры №№17, 19) – полностью «деградированные», и у двух (к-37532, к-36721 – спектры №18, 20) – частично «деградированные». У образца к-36721 (спектр №20) хорошо видно усиление интенсивности отдельных компонентов в нижней части спектра и деградация высокомолекулярных компонентов.

Наиболее вероятной причиной деградации белков семян проанализированных видов вики секции *Peregrinae* является действие протеаз, эндогенных или чужеродных, проявляющих активность в стандартных условиях эксперимента, включающих экстракцию белков из семян 0,025 М трис-глициновым буфером pH 8,3 (см. раздел «Материалы и методы»). Использование в качестве экстрагента 0,14 М NaCl или 0,1 М мочевины приводило к тем же результатам (результаты не приведены). Семена вики, дающие «деградированные» белковые спектры, не имели признаков прорастания, при котором протеолитическая активность в семенах резко возрастает, или внешних признаков повреждения насекомыми-вредите-

лями или патогенами. Несмотря на это, была осуществлена попытка выявить протеазы, ответственные за деградацию белков. Использование ИЭФ и наслаивание на гель желатиновой фотопленки, смоченной соответствующими растворами, как правило, позволяет выявлять активные в прорастающих или в поврежденных вредителями семенах цистеиновые или сериновые протеазы (Konarev, Fomicheva, 1991; Konarev et al., 2019a). В экстрактах из семян вики, дающих как полноценные, так и «деградированные» спектры, следов протеолитической активности данным методом выявить не удалось (результаты не представлены). Также не удалось предотвратить деградацию белков добавлением в экстрагент ингибиторов цистеиновых (PCMB-Na и иодацетамида) и сериновых протеаз (PMSF) (варианты модификаций условий экстракции описаны в разделе «Материалы и методы»; на рисунках не представлено). Среди причин подобных результатов можно предположить неспособность протеазы (или протеаз), деградирующей белки семян вики при стандартных условиях выделения, гидролизовать животный белок желатин, а также нечувствительность данной протеазы к использованным в эксперименте ингибиторам. Семена вики содержат чрезвычайно сложный набор протеаз, которые отличаются как по субстратной специфичности, так и по отношению к ингибиторам. Так, было показано, что у вики посевной (*V. sativa*) только протеазы CPR2 и протеаза А были активны по отношению к желатину, тогда как протеаза CPR1 не гидролизовала данный субстрат, но, как и две упомянутые протеазы, гидролизовала глобулины семян. В свою очередь, ингибитор цистеиновых протеаз E64 подавлял папаин-подобную протеазу А, но не действовал на легумаин-подобную протеазу В (Fischer et al., 2000).

Предположение о том, что деградация белков у образцов видов вики секции *Peregrinae* вызвана аномальной активностью протеаз в стандартных условиях опыта, было проверено путем смешивания в различных пропорциях муки из семян, дающих полноценные спектры, с мукой семян, дающих «деградированные» спектры (рис. 3). Так, например, смеси муки образцов *V. melanops* (к-37524) и *V. aintabensis* (к-37635) или *V. peregrina* (к-35223) и (к-37713) при экстракции белков в стандартных условиях дали «деградированные» спектры. Интересно, что во втором варианте опыта деградация белков была более полной, чем в первом, в котором анализировали смесь муки образцов видов, один из которых не принадлежит к секции *Peregrinae*. В вариантах смеси 4:1 деградация белков была наименьшей, что, видимо, связано с относительно низким содержанием протеаз. Возможно также, что часть белков *V. melanops* более устойчива к аномальным протеазам, характерным для представителей секции *Peregrinae*.

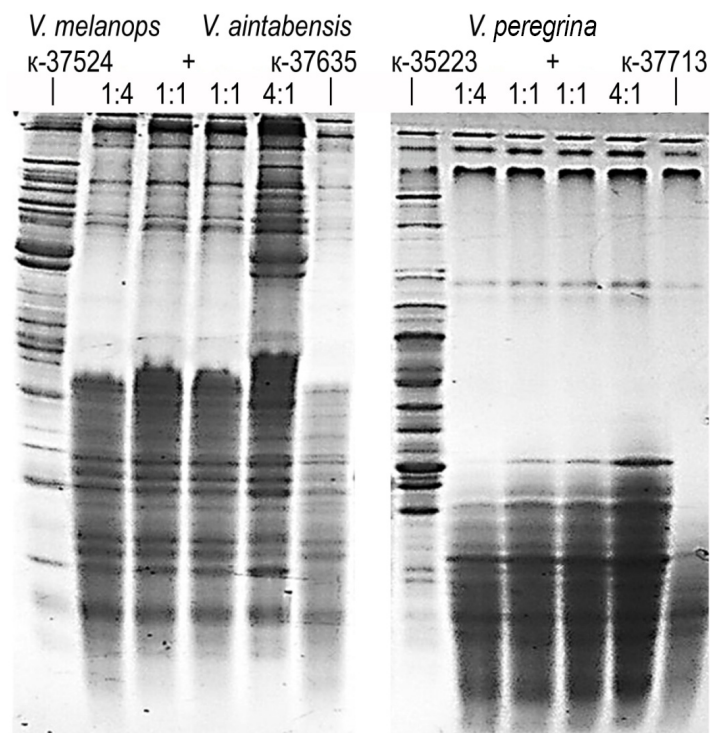


Рис. 3. SDS-электрофорез белков, выделенных в стандартных условиях из семян образцов вики, дающих в стандартных условиях выделения полноценные (к-37524, к-35223) и «деградированные» (к-37635, к-37713) спектры, а также из их смесей в разных соотношениях (1:4, 1:1, 4:1).

Fig. 3. SDS-electrophoresis of proteins isolated under standard conditions from the seeds of vetch accessions, which under standard isolation conditions form complete (k-37524, k-35223) and degraded (k-37635, k-37713) profiles, as well as from their mixtures in different proportions (1:4, 1:1, 4:1).

Эффективным способом инактивации протеаз, например семян злаков, мешающих анализу других белков, является нагревание экстрактов при 80°C (Konarev, Lovegrove, 2012). В свою очередь Fischer с соавторами (Fischer et al. 2000) останавливали протеолиз препаратов глобулинов очищенными цистеиновыми протеазами из семян *V. sativa* добавлением буфера нанесения с 2-меркаптоэтанолом и нагреванием при 95°C.

Нами были проведены эксперименты с нагреванием экстрактов из муки семян вики в нескольких вариантах, описанных в разделе «Материалы и методы». Выделение белков из семян разных видов вики и сои трис-глициновым буфером и 2-меркаптоэтанолом с нагреванием при 80°C в течение 15 мин привело к неожиданным результатам. «Деградированные» спектры получились у образцов вики, в стандартных условиях дающих как полноценные, так и «деградированные» спектры (рис. 4). В то же время спектр белков сои после нагревания не отличался от такового, полученного при стандартных условиях выделения. Возможно, что нагревание экстрактов из семян *V. melanops* и *V. dionysiensis* при 80°C приводит к активации «молчащих» в норме протеаз, в результате чего получились «деградированные» спектры как у *V. aintabensis*. Подобная обработка не привела к изменениям спектра

белков сои, что может быть связано с отличиями протеолитических комплексов у представителей разных родов/видов бобовых.

На рисунке 5 представлены спектры двух образцов *V. aintabensis*, полученные экстракцией муки без нагревания (20°C), а также при 100°C в отсутствии и присутствии 5% 2-меркаптоэтанолa. Если при стандартных условиях выделения (20°C) сформировались «деградированные» спектры, то нагревание экстрактов при 100°C привело к появлению пары белковых компонентов в нижней половине спектров у 9 из 10 семян (рис. 6). Одно семя (дорожка № 2) при 100°C дало почти полноценный спектр (в стандартных условиях экстракт из него не анализировали). При нагревании экстрактов при 100°C с 5% 2-меркаптоэтанолом все 10 семян дали четкие полноценные спектры (рис. 6. 100°C + Me). Следует отметить, что «восстановление» спектров происходило только при добавлении к муке горячего (около 100°C) экстрагента с 2-меркаптоэтанолом непосредственно перед помещением пробирки на кипящую водяную баню. При добавлении непрогретого экстрагента с последующим нагреванием смеси на бане до 100°C успевала произойти деградация белков.

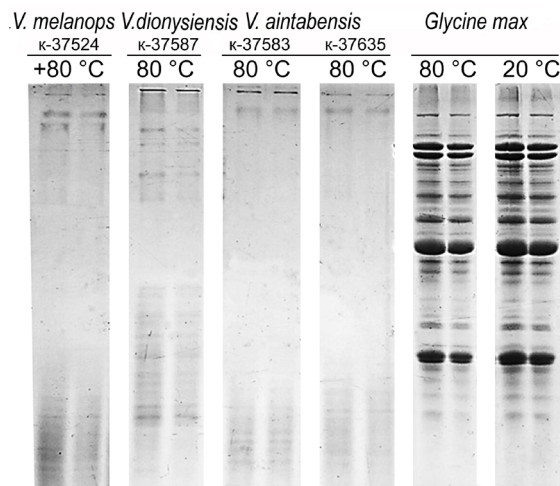


Рис. 4. SDS-электрофорез белков семян образцов видов, дающих в стандартных условиях выделения полноценные (*V. melanops* и *V. dionysiensis*) и «деградированные» (*V. aintabensis*) спектры, а также сои (*Glycine max*), при выделении белков с нагреванием при 80°C с 5% 2-меркаптоэтанолом в течение 15 минут и в стандартных условиях (20°C).

Fig. 4. SDS-electrophoresis of seed proteins of accessions of species that show complete (*V. melanops* and *V. dionysiensis*) and degraded (*V. aintabensis*) profiles under standard isolation conditions, as well as of soybean (*Glycine max*), when isolating proteins by heating at 80°C with 5% 2-mercaptoethanol for 15 minutes and under standard conditions (20°C).

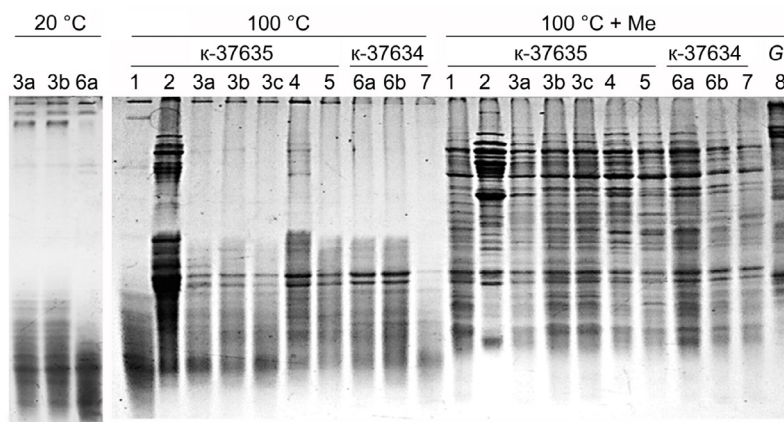


Рис. 5. SDS-электрофорез белков отдельных семян двух образцов вики *V. aintabensis* Boiss & Hausskn. ex Boiss, выделенных с помощью трис-глицинового буфера pH 8.3 в стандартных условиях (20°C), при 100°C без 2-меркаптоэтанола (100°C) и с добавлением 5% 2-меркаптоэтанола (100°C + Me).

Семена отличались по месту и году репродукции. к-37635: 1 – оригинальные семена, полученные из ICARDA (Сирия); 2 – ЕОС, 2022; 3а, 3б, 3с – НПБ ВИР, 2016 (теплица); 4, 5 – НПБ ВИР (поле). к-37634: 6а, 6б, АОС, 2020; 7 – НПБ ВИР, 2016, (теплица). 8 – *G* – соя (*Glycine max*) к-5950. Экстракты для трех методов выделения в случае 3а, 3б и 6а получены из одних и тех же трех семян.

Fig. 5. SDS-electrophoresis of proteins from individual seeds of two *V. aintabensis* Boiss & Hausskn. ex Boiss vetch accessions, isolated with Tris-glycine buffer pH 8.3 under standard conditions (20°C), at 100°C without 2-mercaptoethanol (100°C), and with the addition of 5% 2-mercaptoethanol (100°C + Me).

The seeds differed by the place and year of reproduction. к-37635: 1 – original accession from ICARDA (Syria); 2 – Ekaterininskaya Experiment Station (Russia), 2022; 3а, 3б, 3с – Pushkin, Russia, 2016 (greenhouse); 4, 5, Pushkin (field). к-37634: 6а, 6б, Adler Experiment Station (Russia), 2020; 7 – Pushkin, 2016, (greenhouse). 8 – *G* – soybean (*Glycine max*) к-5950. Extracts for the three isolation methods 3а, 3б and 6а were obtained from the same three seeds.

Экстракция белков с 5% 2-меркаптоэтанолом с нагреванием при 100°C (рис. 6) обеспечила получение четких спектров для семян образцов разных видов секции *Peregrinae*, дающих при стандартных условиях «деградированные» спектры (дорожки промаркированы звездочкой*). При этом у образцов, изначально дающих полноценные спектры (дорожки отмечены буквой n), данная

обработка практически не повлияла на качество и состав спектров как у образцов видов из секции *Peregrinae*, так и у представителей видов других секций, *V. melanops* (к-37261, к-37524) и *V. dionysiensis* (к-37587). Состав спектров белков семян остался после данной термической обработки неизменным и у сои (дорожки со знаками плюс "+" с нагреванием и минус "-" без нагревания).

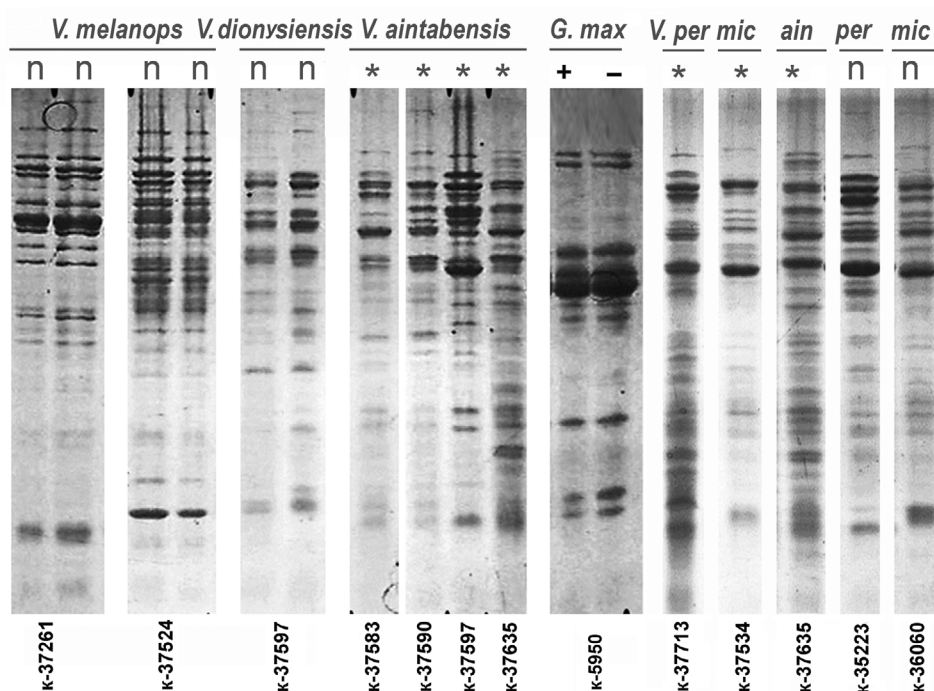


Рис. 6. SDS-электрофорез белков семян образцов видов вики – представителей секции *Peregrinae* и видов других секций.

Экстракты при выделении белков были прогреты при 100°C с 5% 2-меркаптоэтанолом. Буквой "n" и звездочкой* отмечены семена образцов, дающие при стандартных условиях выделения полноценные и «деградированные» спектры соответственно, знаками плюс "+" и минус "-" – экстракты из семян сои после нагревания при 100°C и без него, соответственно

V. per – *V. peregrina*; *mic* – *V. michauxii*; *ain* – *V. aintabensis*; *G. max* – соя (*Glycine max*)

Fig. 6. SDS-electrophoresis of seed proteins of vetch species accessions representing the section *Peregrinae*, and species from other sections.

Extracts were heated at 100°C with 5% 2-mercaptoethanol during protein isolation. The letter "n" and an asterisk * indicate the seeds of accessions that, under standard isolation conditions, show complete and degraded profiles, respectively, plus "+" and minus "-" signs indicate extracts from soybean seeds after heating at 100°C and without it, respectively.

V. per – *V. peregrina*; *mic* – *V. michauxii*; *ain* – *V. aintabensis*; *G. max* – soybeans (*Glycine max*)

Следует отметить, что экстракция с нагреванием при 100°C с 5% 2-меркаптоэтанолом полностью «восстанавливает» спектры практически у всех образцов *V. aintabensis*, но не у всех образцов *V. peregrina*, однако, даже частично «восстановленного» спектра, как правило, достаточно для видовой идентификации образца. Существенным обстоятельством является простота нового подхода и хорошая (или в ряде случаев удовлетворительная) воспроизводимость результатов, что указывает на пригодность модификации метода для практического при-

менения. Можно предположить, что подбор оптимальных условий экстракции (например, точное определение времени прогрева и времени экстракции) позволит повысить в дальнейшем стабильность результатов. Важно, что спектр белков сои, используемый в качестве стандартного для регистрации компонентов белков бобовых, при модификации метода остается практически неизменным, что облегчает интерпретацию результатов.

Заключение

Вполне возможно, что полная или частичная деградация белков семян образцов видов секции *Peregrinae* при экстракции в стандартных условиях при комнатной температуре без 2-меркаптоэтанола обусловлена действием эндогенных протеаз, неактивных при тех же условиях у образцов видов вики из других секций подрода *Vicia* (и других бобовых) и дающих полностью сформированные спектры. По-видимому, экстракция белков при 100°C в присутствии 2-меркаптоэтанола приводит к инактивации этих протеаз, что обеспечивает получение полноценных электрофоретических спектров. Возможно также, что деградация белков у разных представителей подрода *Vicia* при их экстракции при 80°C обусловлена активацией не работающих в стандартных условиях выделения относительно термостабильных протеаз. Интересно, что спектры белков семян сои при такой обработке практически не изменялись. Деградация белков при выделении в стандартных условиях у образцов, например, *V. aintabensis*, не зависела от того, из какой страны происходили семена, в каком месте и в какой год они были воспроизведены. Признаками поражения вредителями или патогенами данные семена не обладали. В связи с этим можно предположить генотипическую детерминированность «склонности» белков семян представителей *Peregrinae* к деградации при выделении в стандартных условиях, причем в наибольшей мере она выражена у образцов *V. aintabensis*, а в наименьшей у *V. michauxii*. Природу протеаз, вызывающих данный тип деградации белков семян, а также механизмы регуляции их активности еще предстоит выяснить. Нельзя также исключать, например, особенность структур, обеспечивающих компартментализацию запасных белков и протеаз в клетках семядолей и зародышевой оси. Кроме того, одним из механизмов регуляции протеолитической деградации белков семян является изменение их конформации, что делает белки более доступными для протеолиза, механизмы которого еще до конца не ясны (Müntz, Shutov, 2002).

Одним из наиболее важных итогов работы является установление возможности применения предлагаемой модификации условий выделения белков семян в сочетании с общепринятым методом SDS-электрофореза для идентификации видов секции *Perigrinae*, для изучения их внутривидовой изменчивости, а также для регистрации коллекционных образцов в рамках единого подхода к изучению белков вики и других бобовых, а именно использования их как генетических маркеров.

References/Литература

- Ali H.B., Osman S.A. Genetic relationship study of some *Vicia* species by FISH and total seed storage protein patterns. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 2020;18(1):37. DOI: 10.1186/s43141-020-00054-6
- Barratt D.H.P. Cultivar identification of *Vicia faba* (L.) by sodium dodecyl sulphate – polyacrylamide gel electrophoresis of seed globulins. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1980;31(8):813-819. DOI: 10.1002/jsfa.2740310811
- Bechkri S., Medoukali I., Khelifi D. Ecogeographic variability and genetic diversity associated with seed albumins, globulins and prolamins patterns in *Vicia* taxa from Algeria. *Botanical studies*. 2017;58:1-5. DOI: 10.1186/s40529-017-0177-7
- Bobkov S.V., Bashkirova K.A. Study of polymorphism of storage proteins in parents and hybrids of wild and cultivated peas. *Zemledelie*. 2022;(5):35-39. [in Russian] (Бобков С.В., Башкирова К.А. Изучение полиморфизма запасных белков у родителей и гибридов дикого и культурного гороха. *Земледелие*. 2022;(5):35-39). DOI: 10.24412/0044-3913-2022-5-35-39
- Bosmali I., Lagiotis G., Haider N., Osathanunkul M., Biliaderis C., Madesis P. DNA-based identification of Eurasian *Vicia* species using chloroplast and nuclear DNA barcodes. *Plants*. 2022;11(7):947. DOI: 10.3390/plants11070947
- Caputo P., Frediani M., Gelati M.T., Venora G., Cremonini R., Ruffini Castiglione M. Karyological and molecular characterisation of subgenus *Vicia* (Fabaceae). *Plant Biosystems – An International Journal Dealing with All Aspects of Plant Biology*. 2013;147(4):1242-1252. DOI: 10.1080/11263504.2013.861532
- Dhull S.B., Kidwai M.K., Noor R., Chawla P., Rose P.K. A review of nutritional profile and processing of faba bean (*Vicia faba* L.). *Legume Science*. 2022;4(3):e129. DOI: 10.1002/leg3.129
- Dorrian K., Mkhabela M., Sapirstein H., Bullock P. Effects of delayed harvest on wheat quality, gluten strength, and protein composition of hard red spring wheat. *Cereal Chemistry*. 2023;100(1):196-212. DOI: 10.1002/cche.10637
- Eggi E.E. Identification of cultivars of narrow-leaved lupine (*Lupinus angustifolius* L.) using the electrophoretic profile of polypeptides in seed proteins: guidelines (Identifikatsiya sortov lyupina uzkolistnogo (*Lupinus angustifolius* L.) s ispol'zovaniem elektroforeticheskogo spektra polipeptidov belkov semyan: metodicheskiye ukazaniya). I.P. Gavril'yuk (ed). St. Petersburg: VIR; 2013. [in Russian] (Егги Э.Э. Идентификация сортов люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) с использованием электрофоретического спектра полипептидов белков семян: методические указания / под ред. И.П. Гаврилюк. Санкт-Петербург: ВИР; 2013).
- Eggi E.E. Electrophoresis of seed proteins for the cultivar identification of high polymorphing crops on the example of eastern galega (*Galega orientalis* Lam.). *Agrarnaya Rossiya = Agrarian Russia*. 2015;(11):14-20. [in Russian] (Егги Э.Э. Электрофорез белков семян для сортовой идентификации высокополиморфных культур на примере козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.). *Аграрная Россия*. 2015;(11):14-20).
- Eggi E.E., Aleksandrova T.G. Determination of an unknown accession of common vetch for compliance with the variety Yubileynaya 110 according to morphology and electrophoresis of seed protein. *Legumes and groat crops*. 2019;4(32):71-81. [in Russian] (Егги Э.Э., Александрова Т.Г. Определение соответствия неизвестного образца вики посевной сорту Юбилейная 110 по данным морфологии и электрофореза белков семян. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2019;4(32):71-81). DOI: 10.24411/2309-348X-2019-11135
- Eggi E.E., Aleksandrova T.G. Comparative characteristics of common vetch (*Vicia sativa* subsp. *sativa*) cultivars based on seed polypeptide patterns. In: *V International Vavilov Conference : celebrating N.I. Vavilov's 135th birthday: Abstracts; 2022 November 21-25; St. Petersburg, Russia*. St. Petersburg: VIR; 2022. p.353-355. [in Russian] (Егги Э.Э., Александрова Т.Г. Сравнительная характеристика сортов вики посевной (*Vicia sativa* subsp. *sativa*) по полипептидным спектрам семян. В кн.: *V Вавиловская международная конференция: к 135-летию со дня рождения Н.И. Вавилова: тезисы докладов; 21-25 ноября 2022 г.; Санкт-Петербург, Россия*. Санкт-Петербург: ВИР; 2022. С.353-355).
- El-Badan G.E., Amin A.W., Ashour F.M., El-Sadek L.M. Allele frequency and genetic diversity of some species of genus *Vicia* L. using SDS-PAGE technique. *Egyptian Journal of Botany*. 2021;61(2):491-511. DOI: 10.21608/ejbo.2021.47720.1579
- Fischer J., Becker C., Hillmer S., Horstmann C., Neubohn B.,

- Schlereth A., Senyuk V., Shutov A., Müntz K. The families of papain- and legumain-like cysteine proteinases from embryonic axes and cotyledons of *Vicia* seeds: developmental patterns, intracellular localization and functions in globulin proteolysis. *Plant molecular biology*. 2000;43:83-101. DOI: 10.1023/A:1006456615373
- Frediani M., Caputo P., Venora G., Ravalli C., Ambrosio M., Cremonini R. Nuclear DNA contents, rDNAs, and karyotype evolution in *Vicia* subgenus *Vicia*: II. Section *Peregrinae*. *Protoplasma*. 2005;226:181-190. DOI: 10.1007/s00709-005-0114-6
- Hasan A.A., Haddad D.A., Ali L.M. The phylogenetic relationships between species of *Vicia* L. based on morphological characteristics and proteins present in seeds. *Asian Journal of Research in Botany*. 2023;6(2):225-232. Available from: <http://science.sdpublishers.org/id/eprint/1656/1/Hasan622023AJRIB106921.pdf> [accessed Jul. 19, 2024].
- Jaaska V., Leht M. Phylogenetic relationships between and within sections *Hypechusa*, *Narbonensis* and *Peregrinae* of genus *Vicia* (Fabaceae) based on evidence from isozymes and morphology. *Central European Journal of Biology*. 2007;2:137-155. DOI: 10.2478/s11535-007-0008-z
- Kakhovskaya I.A., Rudakova A.S., Shutov A.D. Origin and evolution of legumains, Asn-specific seed proteinases. In: *Proceedings of the 2nd International Conference «Agrophysical Trends: from Actual Challenges in Arable Farming and Crop Growing towards Advanced Technologies», devoted to Academician Eugene Ermakov; 2019 October 02-04; Saint Petersburg, Russia*. St. Petersburg: Agrophysical Research Institute; 2019. p.358-362. [in Russian] (Каховская И.А., Рудакова А.С., Шутов А.Д. Происхождение и эволюция легуминазов Asn-специфических протеиназ семян. В кн.: *Материалы II Международной научной конференции «Тенденции развития агрофизики: от актуальных проблем земледелия и растениеводства к технологиям будущего», посвященной памяти академика Е.И. Ермакова; 02-04 октября 2019 г.; Санкт-Петербург, Россия*. Санкт-Петербург: АФИ; 2019. С.358-362). URL: https://www.agrophys.ru/Media/Default/Conferences/2019/sbornik_ARI_2019.pdf [дата обращения: 19.07.2024].
- Khalik K.N.A., Al-Gohary I.H. Taxonomic relationships in some *Vicia* species from Egypt, based on seed morphology and SDS-PAGE of seed proteins. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. 2013;35(4):603-611. DOI: 10.4025/actasciobiolsci.v35i4.19345
- Konarev A.V. Digestive hydrolases of wheat bugs: properties, significance and possible ways to limit their activity. *Plant Protection News*. 2020;103(2):65-86. [in Russian] (Конарев А.В. Пищеварительные гидролазы хлебных клопов: свойства, значение и возможные пути ограничения их активности. *Вестник защиты растений*. 2020;103(2):65-86). DOI: 10.31993/2308-6459-2020-103-2-13279
- Konarev A.V., Fomicheva Yu.V. Cross analysis of the interaction of α -amylase and protease components of insects with protein inhibitors from wheat endosperm. *Biochemistry (Moscow)*. 1991;56(4):419-427. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/235651743> [accessed Jul 19, 2024].
- Konarev A.V., Lovegrove A. Novel detection methods used in conjunction with affinity chromatography for the identification and purification of hydrolytic enzymes or enzyme inhibitors from insects and plants. In: S. Magdeldin (ed.). *Affinity Chromatography*. London, UK: InTechOpen; 2012. p.187-210. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/33056> [accessed Jul 19, 2024]. DOI: 10.5772/37618
- Konarev A., Dolgikh V., Senderskiy I., Konarev A., Kapustkina A., Lovegrove A. Characterisation of proteolytic enzymes of *Eurygaster integriceps* Put. (Sunn bug), a major pest of cereals. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 2019a;22(1):379-385. DOI: 10.1016/j.aspen.2019.02.001
- Konarev A.V., Kochetkov V.V., Bailey J.A., Shewry P.R. The detection of inhibitors of the *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary extracellular proteinases in sunflower. *Journal of Phytopathology*. 1999;147(2):105-108. DOI: 10.1046/j.1439-0434.1999.147002105.x
- Konarev A.V., Loskutov I.G., Shelenga T.V., Horeva V.I., Konarev A.I.V. Plant genetic resources as an inexhaustible source of healthy food products. *Agrarnaya Rossiya = Agrarian Russia*. 2019b;(2):38-48. [in Russian] (Конарев А.В., Лоскутов И.Г., Шеленга Т.В., Хорева В.И., Конарев А.В. Генетические ресурсы растений – неисчерпаемый источник продуктов здорового питания. *Аграрная Россия*. 2019b;(2):38-48). DOI: 10.30906/1999-5636-2019-2-38-48
- Konarev A.V., Tomooka N., Vaughan D.A. Proteinase inhibitor polymorphism in the genus *Vigna* subgenus *Ceratotropis* and its biosystematic implications. *Euphytica*. 2002;123:165-177. DOI: 10.1023/A:1014920309710
- Konarev V.G. (ed.). Identification of varieties and registration of the gene pool of cultivated plants based on seed proteins (Identifikatsiya sortov i registratsiya genofonda kul'turnykh rasteniy po belkam semyan). St. Petersburg: VIR; 2000. [in Russian] (Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / под ред. В.Г. Конарева. Санкт-Петербург: ВИР; 2000).
- Kuerban A., Al-Ghafari A.B., ALGhamadi S.A., Syed F.Q., Mirza M.B., Mohammed F.A., Abulnaja K.O., Alshaibi H.F., Alsufiani H.M., Kumosani T.A., Al-Malki A.L., Moselhy S.S. Potential antiglycation, antioxidant and antiproliferative activities of *Vicia faba* peptides. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2020;14:2155-2162. DOI: 10.1007/s11694-020-00462-9
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680-685. DOI: 10.1038/227680a0
- Leht M., Jaaska V. Phylogenetic position of *Vicia montbretii* and *Lens* species in relation to *Vicia* subgenus *Cracca* (Fabaceae): morphological and isozyme evidence. *Feddes Repertorium. Journal of Botanical Taxonomy and Geobotany*. 2019;130(3):272-288. DOI: 10.1002/fedr.201800019
- López-Román M.I., De la Rosa L., Marcos-Prado T., Ramírez-Parra E. Cross-species transferability of SSR markers for analyzing genetic diversity of different *Vicia* species collections. *Agronomy*. 2024;14(2):326. DOI: 10.3390/agronomy14020326
- Maxted N. A phenetic investigation of *Vicia* L. subgenus *Vicia* (Leguminosae, Viciaeae) *Botanical Journal of the Linnean Society*. 1993;111(2):155-182. DOI: 10.1006/bojl.1993.1013
- Maxted N. A phenetic investigation of *Vicia* section *Peregrinae* Kupicha (Leguminosae, Papilionoideae, Viciaeae). *Edinburgh Journal of Botany*. 1994;51(1):75-97. DOI: 10.1017/S0960428600001736
- Mazin A.M., Eggi E. Comparative evaluation of red clover genotypes with the "Pskovskiy mestnyy dvoukosnyy" variety. *Fodder Production*. 2021;(6):16-21. [in Russian] (Мазин А.М., Егги Э.Э. Сравнительная оценка сортообразцов клевера лугового с оригиналом сорта Псковский местный двукошный. *Кормопроизводство*. 2021(6):16-21). DOI: 10.25685/KRM.2021.35.75.001
- Mirali N. The use of SDS-PAGE seed protein variability within and among accessions to predict the mating system of some *Vicia* species. *Journal of Genetics and Breeding*. 2005;59(3/4):253.
- Mirali N., El-Khouiri S., Rizq F. Genetic diversity and relationships in some *Vicia* species as determined by SDS-PAGE of seed proteins. *Biologia Plantarum*. 2007;51(4):660-666. DOI: 10.1007/s10535-007-0139-0
- Müntz K. Proteases and proteolytic cleavage of storage proteins in developing and germinating dicotyledonous seeds. *Journal of Experimental Botany*. 1996;47(5):605-622. DOI: 10.1093/jxb/47.5.605
- Müntz K., Belozersky M.A., Dunaevsky Y.E., Schlereth A., Tiedemann J. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth. *Journal of Experimental Botany*. 2001;52(362):1741-1752. DOI: 10.1093/jexbot/52.362.1741
- Müntz K., Shutov A.D. Legumains and their functions in plants. *Trends in Plant Science*. 2002;7(8):340-344. DOI: 10.1016/S1360-1385(02)02298-7
- Peršić V., Božinović I., Varnica I., Babić J., Španić V. Impact of fusarium head blight on wheat flour quality: examination of protease activity, technological quality and rheological properties. *Agronomy*. 2023;13(3):662. DOI: 10.3390/agronomy13030662
- Piotrowicz-Cieślak A.I., Krupka M., Michalczyk D.J., Smyk B., Grajek H., Podyma W., Glowacka K. Physiological characteristics

- of field bean seeds (*Vicia faba* var. *minor*) subjected to 30 years of storage. *Agriculture*. 2020;10(11):545. DOI: 10.3390/agriculture10110545
- Potokina E., Endo Y., Eggi E., Ohashi H. Electrophoretic patterns of seed proteins in the East Asian *Vicia* species (Leguminosae) and their systematic utility. *Journal of Japanese Botany*. 2003;78(1):29-37.
- Potokina E., Vaughan D.A., Eggi E.E., Tomooka N. Population diversity of the *Vicia sativa* agg. (Fabaceae) in the flora of the former USSR deduced from RAPD and seed protein analyses. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 2000;47:171-183. DOI: 10.1023/A:1008756420011
- Ribeiro A.C., Teixeira A.R., Ferreira R.B. Characterization of globulins from common vetch (*Vicia sativa* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*. 2004;52(15):4913-4920. DOI: 10.1021/jf049833p
- Salehi B., Abu-Reidah I.M., Sharopov F., Karazhan N., Sharifi-Rad J., Akram M., Daniyal M., Khan F.S., Abbaass W., Zainab R., Carbone K., Fahmy N.M., Al-Sayed E., El-Shazly M., Lucarini M., Durazzo A., Santini A., Martorell M., Pezzani R. *Vicia* plants – A comprehensive review on chemical composition and phytopharmacology. *Phytotherapy Research*. 2021;35(2):790-809. DOI: 10.1002/ptr.6863
- Schlereth A., Becker C., Horstmann C., Tiedemann J., Müntz K. Comparison of globulin mobilization and cysteine proteinases in embryonic axes and cotyledons during germination and seedling growth of vetch (*Vicia sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*. 2000;51(349):1423-1433. DOI: 10.1093/jxb/51.349.1423
- Scholz G., Manteuffel R., Müntz K., Rudolph A. Low-molecular-weight polypeptides of vicilin from *Vicia faba* L. are product of proteolytic breakdown. *European journal of biochemistry*. 1983;132(1):103-107. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1983.tb07332.x
- Shutov A.D., Blattner F.R., Kakhovskaya I.A., Müntz K. New aspects of the molecular evolution of legumains, Asn-specific cysteine proteinases. *Journal of Plant Physiology*. 2012;169(3):319-321. DOI: 10.1016/j.jplph.2011.11.005
- Tarlakovskaya A.M., Eggi E.E., Gavriluyk I.P. Belyaeva Zh.I. (comp.). Identification of pea varieties by electrophoresis of seed proteins: guidelines (Identifikatsiya sortov gorokha metodom elektroforeza belkov semyan: metodicheskiye ukazaniya / sost.: A.N. Tarlovskaya, Э.Э. Егги, И.П. Гаврилюк, Ж.И. Беляева; под ред. В.Г. Конарева. Ленинград: ВИР; 1990).
- Tripathy S.K. Legume seed storage proteins – A review. *Advances in Bioresearch*. 2018;9(6):152-162. DOI: 10.15515/abr.0976-4585.9.6.152162
- Warsame A.O., O'Sullivan D.M., Tosi P. Seed storage proteins of faba bean (*Vicia faba* L): Current status and prospects for genetic improvement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018;66(48):12617-12626. DOI: 10.1021/acs.jafc.8b04992
- Wong J.H., Ng T.B. 4.60 - Plant Biochemistry: Antifungal Proteins Protecting Plants from Fungal Pathogens. In: M. Moo-Young (ed.). *Comprehensive Biotechnology*. (2nd ed.). Amsterdam; 2011. Vol. 4. p.745-756. DOI: 10.1016/B978-0-08-088504-9.00013-1
- Wu F.F., Sun W., Liu F., Gao Q., Jin M., Liu B., Wang X.G. Phylogenetic relationships in *Vicia* subgenus *Vicilla* (Fabaceae) based on combined evidence from DNA sequences. *Legume Research – An International Journal*. 2021;44(8):882-887. DOI: 10.18805/LR-596
- Yassen A.A.M., Taha M.G.A., Ibrahim M.M., Khalifa Y.A.M. Identification of faba bean (*Vicia faba* L.) protein by electrophoresis. *Archives of Agriculture Sciences Journal*. 2022;5(3):261-274. DOI: 10.21608/aasj.2022.286228
- Zhu X., Hua Y., Li X., Kong X., Chen Y., Zhang C. Growing of fungi on the stored low denatured defatted soybean meals and the hydrolysis of proteins and isoflavone glycosides by fungal enzymes. *Food Research International*. 2023;163:112261. DOI: 10.1016/j.foodres.2022.112261

Информация об авторах

Александр Васильевич Конарев, доктор биологических наук, главный специалист, лаборатория сельскохозяйственной энтомологии, Всероссийский научно-исследовательский институт защиты растений (ВИЗР), 196608 Россия, Санкт-Петербург, Пушкин, ш. Подбельского, д. 3, alv-konarev@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5148-2850>

Элли Эвартовна Егги, кандидат биологических наук, ведущий специалист, отдел биохимии и молекулярной биологии, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, zininaanna@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0009-9554-4855>

Татьяна Геннадьевна Александрова, научный сотрудник, отдел генетических ресурсов зерновых бобовых культур, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений им. Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, t.alexandrova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9152-4528>

Information about the authors

Alexander V. Konarev, Dr. Sci. (Biology), Chief Specialist, Laboratory of Agricultural Entomology, All-Russian Institute of Plant Protection (VIZR), 3, Podbelskogo Highway, Pushkin, St. Petersburg, 196608 Russia, alv-konarev@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5148-2850>

Elly E. Eggi, Cand. Sci. (Biology), Leading Specialist, Department of Biochemistry and Molecular Biology, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, zininaanna@yandex.ru, <https://orcid.org/0009-0009-9554-4855>

Tatiana G. Aleksandrova, Researcher, Department of Genetic Resources of Grain Legumes, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, t.alexandrova@vir.nw.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9152-4528>

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests: the authors declare no conflicts of interests.

Статья поступила в редакцию 03.08.2024; одобрена после рецензирования 20.08.2024; принята к публикации 09.09.2024.

The article was submitted on 03.08.2024; approved after reviewing on 20.08.2024; accepted for publication on 09.09.2024.