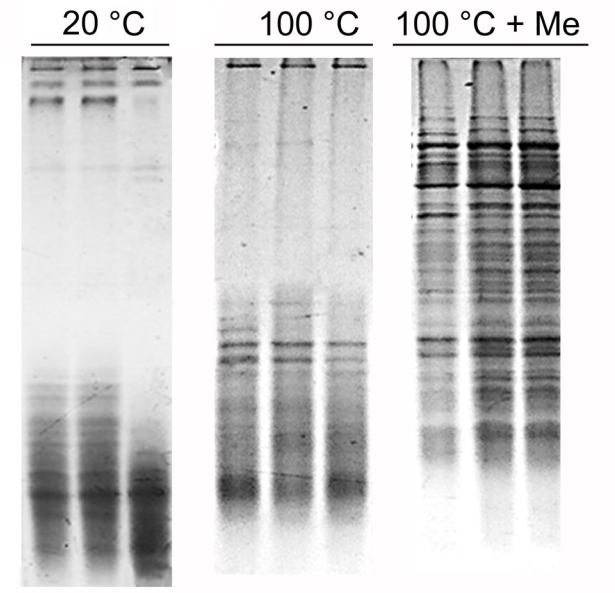
ISSN: 2658-6266 (Print)
ISSN: 2658-6258 (Online)

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

7(3), 2024



V. michauxii Sprengel
k-37534

Vicia peregrina L.
k-36771

V. aintabensis Boiss & Hausskn. ex Boiss
k-37635

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО
ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ВСЕРОССИЙСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИЧЕСКИХ
РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ ИМЕНИ Н.И. ВАВИЛОВА (ВИР)

THE MINISTRY OF SCIENCE AND HIGHER
EDUCATION OF THE RUSSIAN FEDERATION
FEDERAL RESEARCH CENTER
THE N.I. VAVILOV ALL-RUSSIAN INSTITUTE OF
PLANT GENETIC RESOURCES (VIR)

НАУЧНЫЙ РЕЦЕНЗИРУЕМЫЙ ЖУРНАЛ

БИОТЕХНОЛОГИЯ И СЕЛЕКЦИЯ РАСТЕНИЙ

2024, 7(3)

ОСНОВАН В 2018 ГОДУ
ПЕРИОДИЧНОСТЬ 4 РАЗА В ГОД

Для биотехнологов, селекционеров, генетиков, преподавателей вузов биологического и сельскохозяйственного профиля.

e-mail: pbi@vir.nw.ru

190000 Россия, г. Санкт-Петербург,
ул. Б. Морская, 42, 44

© Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических ресурсов
растений имени Н.И. Вавилова (ВИР)

DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3
УДК: 573.6:631.527

ПИ № ФС 77–74475
ISSN: 2658-6266 (Print)
ISSN: 2658-6258 (Online)

SCIENTIFIC PEER REVIEWED JOURNAL

PLANT BIOTECHNOLOGY AND BREEDING

2024, 7(3)

FOUNDED IN 2018
PUBLISHED 4 TIMES ANNUALLY

Addressed to biotechnologists, geneticists, plant breeders and lecturers of biological and agricultural universities and colleges.

e-mail: pbi@vir.nw.ru

42, 44 Bolshaya Morskaya Street,
St. Petersburg 190000, Russia

© Federal Research Center
the N.I. Vavilov All-Russian Institute
of Plant Genetic Resources (VIR)

На обложке:

Фото. Фото. Семена образцов трех видов вики – *Vicia peregrina* L., V. *aintabensis* Boiss. & Hausskin. ex Boiss и *V. michauxii* Sprengel – секции *Peregrinae* и электрофоретические спектры белков семян образцов вики *V. aintabensis* Boiss & Hausskn. ex Boiss, выделенных в стандартных и модифицированных условиях. Особенность белков семян представителей данной секции вики – протеолитическая деградация при стандартных для бобовых условиях выделения, которая может быть предотвращена повышением температуры до 100°C и добавлением 2-меркаптоэтанола.

Материалы к статье: Конарев А.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.

Cover photo:

Photos. Seeds of the three vetch species – *Vicia peregrina* L., *V. aintabensis* Boiss. & Hausskin. ex Boiss and *V. michauxii* Sprengel – section *Peregrinae* and electrophoretic profiles of seed proteins of *V. aintabensis* Boiss & Hausskn. ex Boiss vetch accessions, isolated under standard and modified conditions. A feature of the seed proteins of this section vetch representatives is proteolytic degradation under standard for legumes conditions of protein extraction, which can be prevented by rising temperature to 100°C and addition of 2-mercaptoethanol.

Materials for the article: 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.

ISSN 2658-6266 (Print)
ISSN 2658-6258 (Online)

Биотехнология и селекция растений

2024 Том 7 № 3

DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3
https://biosel.elpub.ru

Научный рецензируемый журнал
Издается с 2018 г.

Издание зарегистрировано Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)
Свидетельство о регистрации СМИ: ПИ № ФС 77 - 74475 от 30.11.2018
Учредитель: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова»

Главный редактор:
Е. К. Хлесткина – д.б.н., профессор РАН (Россия)

Заместители главного редактора:
Т. А. Гавриленко – д.б.н. (Россия)
И. Н. Анисимова – д.б.н. (Россия)
Л. Ю. Новикова – д.с.-х.н. (Россия)

Ответственный секретарь:
Н. А. Оськина

Редакционный совет:
О. С. Афанасенко – д.б.н., академик РАН (Россия)
Г. А. Баталова – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
Р. К. Берсимбаев – д.б.н., академик НАН РК (Казахстан)
Л. А. Беспалова – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
С. И. Гриб – д.с.-х.н., академик НАНБ (Беларусь)
Е. А. Егоров – д.э.н., академик РАН (Россия)
В. Г. Еремин – д.с.-х.н., профессор РАН (Россия)
Г. В. Еремин – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
Г. И. Карлов – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)
А. В. Кильчевский – д.б.н., академик НАНБ (Беларусь)
Н. А. Колчанов – д.б.н., академик РАН (Россия)
В. Н. Корзун – д-р (Германия)
А. В. Кочетов – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)
Н. В. Кухарчик – д.с.-х.н. (Беларусь)
В. М. Лукомец – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
Л. А. Лутова – д.б.н. (Россия)
С. Мишева – д-р (Болгария)
А. И. Моргунов – д-р (Турция)
В. Ройчев – д.с.-х.н. (Болгария)
А. А. Романенко – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
А. В. Рындин – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
Е. Н. Седов – д.с.-х.н., академик РАН (Россия)
И. А. Тихонович – д.б.н., академик РАН (Россия)
П. Н. Харченко – д.б.н., академик РАН (Россия)
Л. В. Хотылева – д.б.н., академик НАНБ (Беларусь)
В. К. Шумный – д.б.н., академик РАН (Россия)

Редакционная коллегия:
Е. Е. Андронов – к.б.н. (Россия)
Д. А. Афонников – к.б.н. (Россия)
А. Х. Баймиев – д.б.н. (Россия)
И. А. Белан – к.с.-х.н. (Россия)
А. Г. Беседин – к.с.-х.н. (Россия)
М. А. Вишнякова – д.б.н. (Россия)
В. А. Гаврилова – д.б.н. (Россия)
С. В. Гаркуша – д.с.-х.н. (Россия)
Т. А. Гасанова – к.с.-х.н. (Россия)
С. В. Герасимова – к.б.н. (Россия)
М. С. Гинс – д.б.н., чл.-корр. РАН (Россия)
С. В. Гончаров – д.б.н. (Россия)
Р. О. Давоян – д.б.н. (Россия)
Я. Н. Демурин – д.б.н. (Россия)
М. Г. Дивашук – к.б.н. (Россия)
Е. В. Думачева – д.б.н. (Россия)
С. Н. Еланский – д.б.н. (Россия)
О. В. Еремина – д.с.-х.н. (Россия)
А. П. Ермишин – д.б.н. (Беларусь)
М. В. Ефимова – к.б.н. (Россия)
Р. Ш. Заремук – д.с.-х.н. (Россия)
С. В. Зеленцов – д.с.-х.н., чл.-корр. РАН (Россия)
Е. Т. Ильницкая – к.б.н. (Россия)
Р. Н. Календарь – к.б.н. (Казахстан)
Н. Н. Карпун – д.б.н. (Россия)
В. С. Ковалев – д.с.-х.н. (Россия)
Н. Н. Коваленко – д.б.н. (Россия)
Е. З. Кочиева – д.б.н. (Россия)
Б. Р. Кулуев – д.б.н. (Россия)
К. У. Куркиев – д.б.н. (Россия)
С. В. Кушнаренко – к.б.н. (Казахстан)
И. Н. Леонова – д.б.н. (Россия)
И. Е. Лихенко – д.с.-х.н. (Россия)
В. В. Лиховской – д.с.-х.н. (Россия)
П. Н. Мальчиков – д.с.-х.н. (Россия)
Т. В. Матвеева – д.б.н. (Россия)
Н. В. Мироненко – д.б.н. (Россия)
И. В. Митрофанова – д.б.н. (Россия)
Е. И. Михайлова – д.б.н. (Россия)
С. В. Осипова – д.б.н. (Россия)
В. Н. Подорожный – к.с.-х.н. (Россия)
Т. Г. Причко – д.с.-х.н. (Россия)
Т. А. Рожмина – д.б.н. (Россия)
А. В. Смыков – д.с.-х.н. (Россия)
А. А. Соловьев – д.б.н., профессор РАН (Россия)
И. И. Супрун – к.б.н. (Россия)
К. Г. Ткаченко – д.б.н. (Россия)
Е. К. Туруспеков – к.б.н. (Казахстан)
Е. В. Ульяновская – д.с.-х.н. (Россия)
О. Ю. Урбанович – д.б.н. (Беларусь)
Ю. В. Фотев – к.с.-х.н. (Россия)
Э. Б. Хатефов – д.б.н. (Россия)
Я. А. Цепилов – к.б.н. (Россия)
О. Ю. Шоева – к.б.н. (Россия)
Л. А. Эльконин – д.б.н. (Россия)
Г. В. Якуба – к.б.н. (Россия)

© Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова, 2024

ISSN 2227-8834 (Print)
ISSN 2619-0982 (Online)

Plant Biotechnology and Breeding

2024 Volume 7 No 3
DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3
https://biosel.elpub.ru

Scientific Peer Reviewed Journal

Founded in 2018

Founder: Federal Research Center
the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources

Editor-in-Chief:
E. K. Khlestkina – Dr. Sci. in Biol., Professor. (Russia)

Deputy Editors-in-Chief:
T. A. Gavrilenko – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I. N. Anisimova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
L. Yu. Novikova – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)

Executive Secretary:
N. A. Oskina

Editorial council:

O. S. Afanasenko – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
G. A. Batalova – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
R. K. Bersimbaev – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the NAS RK (Kazakhstan)
L. A. Bespalova – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
E. A. Egorov – Dr. Sci. in Econ., Full Member of the RAS (Russia)
G. V. Eremin – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
V. G. Eremin – Dr. Sci. in Agricul., Professor (Russia)
S. I. Grib – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the NAS of Belarus (Belarus)
G. I. Karlov – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)
P. N. Kharchenko – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
L. V. Khotyleva – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the NAS of Belarus (Belarus)
A. V. Kilchevsky – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the NAS of Belarus (Belarus)
A. V. Kochetov – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)
N. A. Kolchanov – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
V. N. Korzun – Dr. (Germany)
N. V. Kukharchik – Dr. Sci. in Agricul. (Belarus)
V. M. Lukomets – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
L. A. Lutova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. Misheva – Dr. (Bulgaria)
A. I. Morgunov – Dr. (Turkey)
A. A. Romanenko – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
A. V. Ryndin – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
V. Roychev – Dr. Sci. in Agricul. (Bulgaria)
E. N. Sedov – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)
V. K. Shumny – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)
I. A. Tikhonovich – Dr. Sci. in Biol., Full Member of the RAS (Russia)

Editorial board:

D. A. Afonnikov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E. E. Andronov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
A. H. Bajmiev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I. A. Belan – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
A. G. Besedin – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
R. O. Davoyan – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
Ya. N. Demurin – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
M. G. Divashuk – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E. V. Dumacheva – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
M. V. Efimova – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
S. N. Elansky – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
L. A. Elkonin – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
O. V. Eremina – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
A. P. Ermishin – Dr. Sci. in Biol. (Belarus)
Yu. V. Fotev – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
S. V. Garkusha – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T. A. Gasanova – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
V. A. Gavrilova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. V. Gerasimova – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
M. S. Gins – Dr. Sci. in Biol., Corr. Member of the RAS (Russia)
S. V. Goncharov – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
E. T. Ilnitskaya – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
R. N. Kalendar – Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
N. N. Karpun – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
E. B. Khatefov – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
E. Z. Kochieva – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
N. N. Kovalenko – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
V. S. Kovalev – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
B. R. Kuluev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
K. U. Kurkiev – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. V. Kushnarenko – Cand. Sci. in Biol. (Kazakhstan)
I. N. Leonova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I. E. Lihenko – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
V. V. Likhovskoi – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
P. N. Malchikov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T. V. Matveeva – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
N. V. Mironenko – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
I. V. Mitrofanova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
E. I. Mikhailova - Dr. Sci. in Biol. (Russia)
S. V. Osipova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
V. N. Podorozhniy – Cand. Sci. in Agricul. (Russia)
T. G. Prichko – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
T. A. Rozhmina – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
O. Yu. Shoeva – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
A. V. Smykov – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
A. A. Soloviev – Dr. Sci. in Biol., Professor (Russia)
I. I. Suprun – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
K. G. Tkachenko – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
Ya. A. Tsepilov – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
E. K. Turuspekov – Cand. Sci. in Biol.
E. V. Ulyanovskaya – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
O. Yu. Urbanovich – Dr. Sci. in Biol. (Belarus)
M. A. Vishnyakova – Dr. Sci. in Biol. (Russia)
G. V. Yakuba – Cand. Sci. in Biol. (Russia)
R. Sh. Zaremuk – Dr. Sci. in Agricul. (Russia)
S. V. Zelentsov – Dr. Sci. in Agricul., Full Member of the RAS (Russia)

© Federal Research Center
the N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ОТ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА 4

Е. К. Хлесткина

ВСТУПИТЕЛЬНАЯ СТАТЬЯ

ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ 5

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

Научная статья

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

Шамшин И.Н., Ильичев А.С., Фомичева М.Г., Грошева Е.В. 19

Научная статья

Поиск генов устойчивости к болезням томата с использованием молекулярных маркеров для создания новых генотипов

СОХРАНЕНИЕ ГЕНТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСЕНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ 31

Камнев А.М., Жидехина Т.В., Антонова О.Ю., Дунаева С.Е., Чухина И.Г., Гавриленко Т.А.

Научная статья

Номенклатурные стандарты и микросателлитные профили сортов малины селекции Федерального научного центра им. И.В. Мичурина

Сеферова И.В., Филипенко Г.И., Забегаева О.Н., Бойко А.П., Некрасов А.Ю., Новикова Л.Ю. 42

Научная статья

Всхожесть семян сои после низкотемпературного хранения и её зависимость от погодно-климатических условий в местах репродукции образцов

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ 53

Катрушенко А.А., Тимкин П.Д., Пензин А.А.

Краткое сообщение

Молекулярно-генетический инструментарий для анализа дифференциальной экспрессии генов субъединиц β-конглицининов сои

Хотылева Л.В., Хлесткина Е.К., Матыс И.С. 61

Краткое сообщение

К юбилею академика НАН Беларуси Станислава Ивановича Гриба

CONTENTS

FROM THE EDITOR IN CHIEF 4

E. K. Khlestkina

INTRODUCTORY ARTICLE

STUDY OF PLANT GENETIC RESOURCES USING MOLECULAR GENETICS METHODS 5

Konarev Al.V., Eggi E.E., Aleksandrova T.G.

Original article

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

Shamshin I.N., Ilyichev A.S., Fomicheva M.G., Grosheva E.V. 19

Original article

A search for tomato disease resistance genes using molecular markers to create new genotypes

CONSERVATION OF PLANT GENETIC RESOURCES USING BIOTECHNOLOGICAL APPROACHES 31

Kamnev A.M., Zhidekhina T.V., Antonova O.Yu., Dunaeva S.E., Chukhina I.G., Gavrilenko T.A.

Original article

Nomenclatural standards and microsatellite profiles of raspberry cultivars bred at the I.V. Michurin Federal Scientific Center

Seferova I.V., Filipenko G.I., Zabegaeva O.N., Boyko A.P., Nekrasov A.Yu., Novikova L.Yu. 42

Original article

Germination of soybean seeds after low-temperature storage and its dependence on weather and climate conditions in the places of reproduction of accessions

BRIEF COMMUNICATIONS 53

Katrushenko A.A., Timkin P.D., Penzin A.A.

Brief communication

A molecular genetic toolkit for the differential expression analysis of soybean β-conglycinin subunit genes

Khotyleva L.V., Khlestkina E.K., Matys I.S. 61

Brief communication

On the Anniversary of the Academician of the National Academy of Sciences of Belarus Stanislav Ivanovich Grib

Уважаемые читатели!

Представляем вашему вниманию выпуск, посвященный применению современных технологий для стратегии сохранения генетических ресурсов растений, идентификации сортов и видов, а также при отборе генотипов в селекционном процессе.

Статья А.М. Камнева с соавторами, представленная в настоящем выпуске, продолжает цикл публикаций по реализации комплексной стратегии регистрации отечественных сортов вегетативно размножаемых культур в генбанке, которая включает в себя создание и сохранение в научном гербарии номенклатурного стандарта сорта, его молекулярно-генетическую паспортизацию и сохранение в живом виде в *in vitro* и крио- коллекциях ВИР. До настоящего времени данная стратегия полностью была реализована только для отечественных сортов картофеля (*Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(3,4); 2022;5(4); 2023;6(2)). Статья А.М. Камнева с соавторами впервые демонстрирует данный комплексный подход на примере ягодных культур. Обнародованы номенклатурные стандарты сортов малины, созданных в Федеральном научном центре им. И.В. Мичурина, приведены микросателлитные профили этих сортов и данные о включении образцов в полевую и *in vitro* коллекции ВИР.

Авторы следующей публикации, И.И. Шамшин и другие, продемонстрировали возможность маркер-контролируемого подбора родительских пар для скрещиваний томата с целью выведения форм, устойчивых к фитофторозу, являющихся селекционными достижениями.

В публикации А.А. Катрушенко с соавторами предложен новый молекулярно-генетический инструментарий, с помощью которого можно осуществлять дальнейший анализ дифференциальной экспрессии генов, связанных с качественным и количественным составом соевого белка.

Работа Ал.В. Конарева с соавторами, посвященная идентификации таксонов вики – культуры, представленной многочисленными видами, – позволила прояснить природу деградации белков семян представителей секции *Peregrinae* при их экстракции и выявляемой при проведении SDS электрофореза.

Работа И.В. Сеферовой с соавторами на примере сои, исследованной после длительного хранения семян при –10°С, демонстрирует, что независимо от развития применяемых технологий неизменно актуальным остается основанный Николаем Ивановичем Вавиловым эколого-географический принцип сохранения генетических ресурсов растений: наиболее высокие показатели всхожести семян наблюдаются в том случае, если естественные условия среды в месте репродукции образцов растений являются оптимальными для данной культуры.

Дорогие друзья, редакция журнала поздравляет с юбилеем селекционера, лидера белорусской научной школы в области селекции и семеноводства академика Станислава Ивановича Гриба, доктора сельскохозяйственных наук, профессора, заслуженного деятеля науки и лауреата Государственной премии Республики Беларусь. Представляем читателям публикацию, посвященную юбиляру. Желаем Станиславу Ивановичу новых селекционных достижений, много сил и бодрости, долгих продуктивных лет и крепчайшего здоровья!

Главный редактор,
профессор РАН
Е.К. Хлесткина

Научная статья
УДК 633.352:581.48:577.112:577.156
DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o2

(cc) BY

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

Ал. В. Конарев[1], Э. Э. Егги[2], Т. Г. Александрова[2]

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

[2]Федеральный 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, *Hypechusa* (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, видовая 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. Konarev[1], Elly E. Eggi[2], Tatiana G. Aleksandrova[2]

[1]All-Russian Institute of Plant Protection, St. Petersburg, Russia

[2]N.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 *Bithynicae* (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 (Tipathy, 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 легумаин-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. & Hausskin 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. & Hausskin. 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. & Hausskin. 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°С в течение 15 мин;
- без 2-меркаптоэтанола на кипящей водяной бане (100°С) в течение 2-5 мин;
- с 5% 2-меркаптоэтанолом на кипящей водяной бане (100°С) в течение 2-5 мин;

б) без нагревания –

экстракция из муки с добавлением ингибиторов цистеиновых протеаз

- 1-10 мМ пара-хлормеркурибензоата Na (PCMB-Na)
- 1-10 мМ иодацетамида;

экстракция из муки с добавлением ингибитора сериновых протеаз – 1-10 мМ 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 изоэлектрофокусированию (ИЭФ) в гелях Phast pH 3-9 на аппарате PhastSystem (Amersham Biosciences, Великобритания). На гель накладывали фотопленку Фото-65, смоченную раствором 0,1 M NaH_2PO_4 pH 5,0 с 0,1 M дитиоэритритолом (для выявления цистеиновых протеаз) или раствором 0,1 M 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).

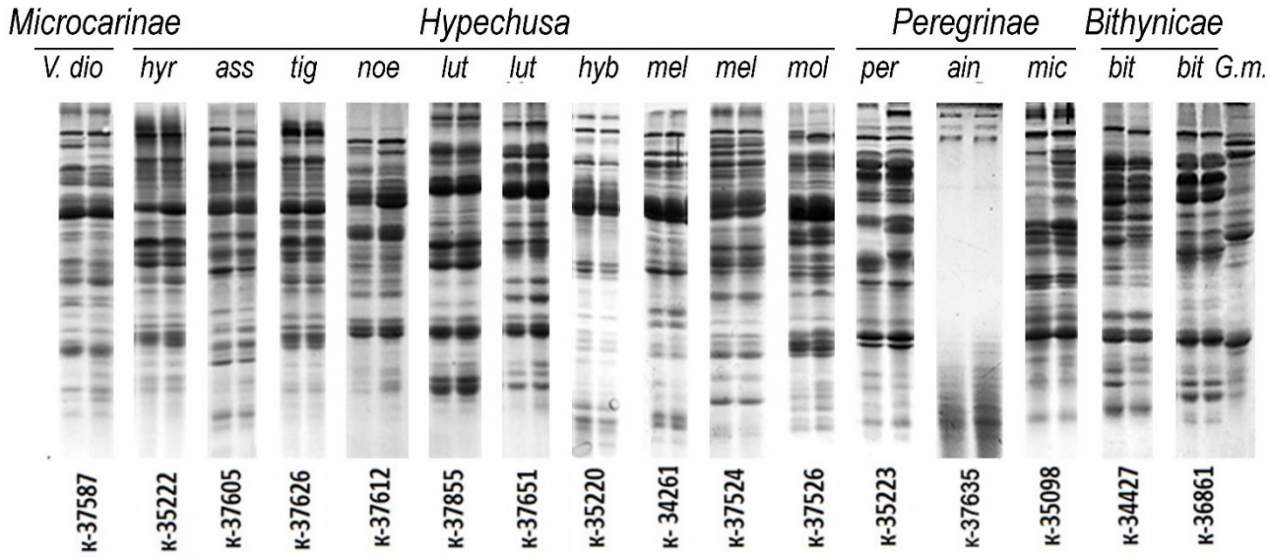


Рис. 1. Спектры белков семян видов вики (*Vicia* L.) – представителей секций *Microcarinae* Maxted, *Hypechusa* (Alef) Asch. & Graebner, *Peregrinae* Kupicha и *Bithynicae* (B. Fedtsch.) Maxted подрода *Vicia*, разделённых методом SDS-электрофореза при стандартных условиях выделения.

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	*Vicia. dionysiensis* Mout.	*Microcarinae* Maxted	1	1	0
2	*V. assyriaca* Boiss.	*Hypechusa* (Alef.) Asch. & Graebner	1	1	0
3	*V. tigridis* Mout.		1	1	0
4	*V. hyrcanica* Fisch. et C.A. Mey.		20	20	0
5	*V. noeana* Reut. ex Boiss.		2	2	0
6	*V. lutea* L.		26	26	0
7	*V. hybrida* L.		4	4	0
8	*V. melanops* Sibth. et Smith		2	2	0
9	*V. mollis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss.		1	1	0
10	*V. peregrina* L.	*Peregrinae* Kupicha	13	1	12
11	*V. aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss.		7	0	7
12	*V. michauxii* Sprengel		9	6	3
13	*V. bithynica* (L.) L.	*Bithynicae* (B. Fedtsch. ex Radzhi) Maxted	7	7	0
	Итого		**94**	**72**	**22**

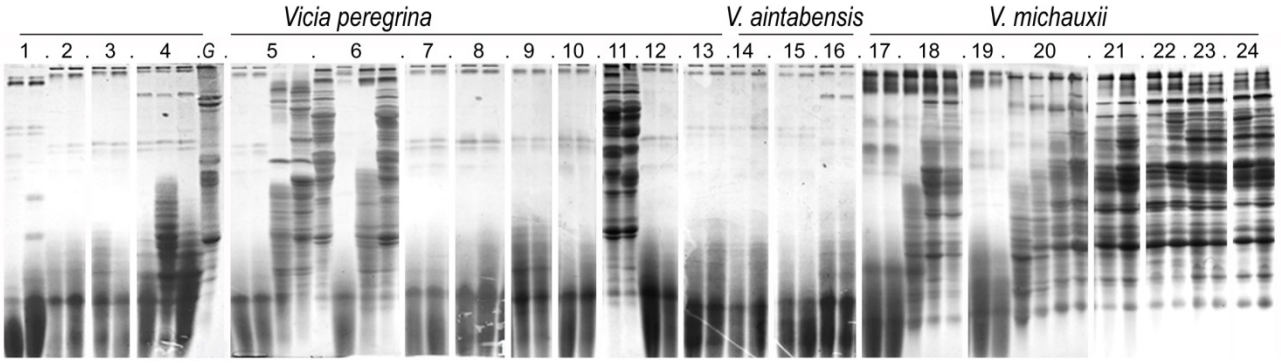


Рис. 2. Электрофоретические спектры белков отдельных семян образцов* видов вики из секции *Peregrinae* Kupicha при стандартных условиях выделения

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 идентифицируются 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	*Vicia peregrina* L	к-36845	Сирия	АОС ВИР	2019	1
2	*V. peregrina* L.	к-36769	Армения	АОС ВИР	2017	2
3	*V. peregrina* L.	к-36771	Азербайджан	АОС ВИР	2017	3
4	*V. peregrina* L.	к-36065	Грузия	ЕОС ВИР	2021	4
5	*V. peregrina* L.	к-37887	Узбекистан	АОС ВИР	2020	5
6	*V. peregrina* L.	к-35385	Кыргызстан	ЕОС ВИР	2021	6
7	*V. peregrina* L.	к-35190	Туркменистан	АОС ВИР	2017	7
8	*V. peregrina* L.	к-36766	Таджикистан	ЕОС ВИР	2021	8
9	*V. peregrina* L.	к-35794	Афганистан	АОС ВИР	2017	9
10	*V. peregrina* L.	к-35121	Туркменистан	АОС ВИР	2017	10
11	*V. peregrina* L.	к-35223	Азербайджан	ЕОС ВИР	2021	11
12	*V. peregrina* L.	к-37713	Армения	АОС ВИР	2020	12
13	*V. peregrina* L.	к-35196	Грузия	АОС ВИР	2017	13
14	*V. aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	к-37583	Италия	НПБ ВИР	2022	-
15	*V. aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	к-37590	Сирия	НПБ ВИР	2023	-
16	*V. aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	к-37597	Турция	НПБ ВИР	2022	-
17	*V. aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	к-37637	Турция	ДОС ВИР	2022	14
18	*V. aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	к-37634	Сирия	ЕОС ВИР	2022	15
19	*V. aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	к-37635	Сирия	ЕОС ВИР	2022	16
20	*V. aintabensis* Boiss. & Hausskn. ex Boiss.	к-37636	Сирия	НПБ ВИР	2016	-
21	*V. michauxii* Sprengel	к-37862	Сирия	АОС ВИР	2018	17
22	*V. michauxii* Sprengel	к-37532	Турция	АОС ВИР	2016	18
23	*V. michauxii* Sprengel	к-37534	Турция	АОС ВИР	2016	19
24	*V. michauxii* Sprengel	к-36721	Армения	ЕОС ВИР	2021	20
25	*V. michauxii* Sprengel	к-35113	Узбекистан	АОС ВИР	2017	21
26	*V. michauxii* Sprengel	к-35098	Узбекистан	ЕОС ВИР	2021	22
27	*V. michauxii* Sprengel	к-35149	Кыргызстан	ЕОС ВИР	2021	23
28	*V. michauxii* Sprengel	к-31487	Таджикистан	АОС ВИР	2016	24
29	*V. michauxii* 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, чётко 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-вредителями 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*.

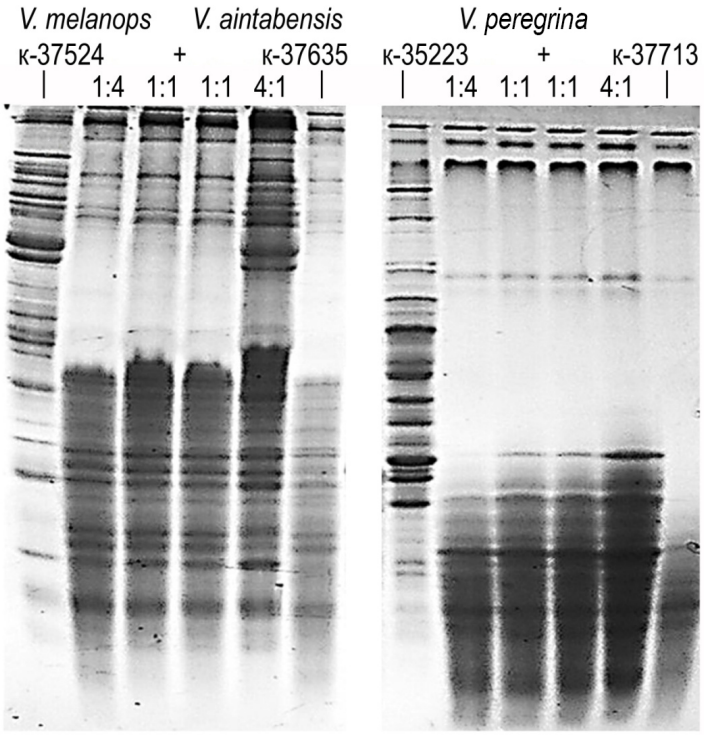


Рис. 3. SDS-электрофорез белков, выделенных в стандартных условиях из семян образцов вики, дающих в стандартных условиях выделения полноценные (к-37524, к-35223) и «деградированные» (к-37635, к-37713) спектры, а также из их смесей в разных соотношениях (1:4, 1:1, 4:1).

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-меркаптоэтанола. 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.

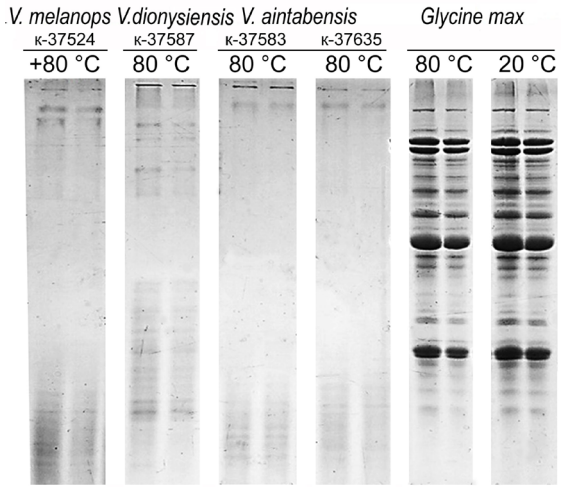


Рис. 4. SDS-электрофорез белков семян образцов видов, дающих в стандартных условиях выделения полноценные (*V. melanops* и *V. dionysiensis*) и «деградированные» (*V. aintabensis*) спектры, а также сои (*Glycine max*), при выделении белков с нагреванием при 80ºС с 5% 2-меркаптоэтанолом в течение 15 минут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

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 80ºC with 5% 2-mercaptoethanol for 15 minutes and under standard conditions (20ºC).

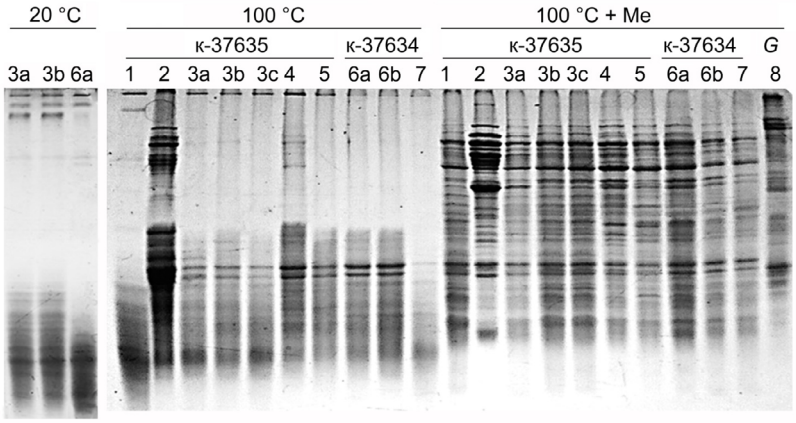


Рис. 5. SDS-электрофорез белков отдельных семян двух образцов вики *V. aintabensis* Boiss & Hausskn. ex Boiss, выделенных с помощью трис-глицинового буфера pH 8.3 в стандартных условиях (20°C), при 100°C без 2-меркаптоэтанола (100°C) и с добавлением 5% 2-меркаптоэтанола (100°C + Me).
Семена отличались по месту и году репродукции. к-37635: 1 – оригинальные семена, полученные из ICARDA (Сирия); 2 – ЕОС, 2022; 3a, 3b, 3c – НПБ ВИР, 2016 (теплица); 4, 5 – НПБ ВИР (поле). к-37634: 6a, 6b, АОС, 2020; 7 – НПБ ВИР, 2016, (теплица). 8 **–** *G* – соя **(***Glycine max***)** к-5950. Экстракты для трех методов выделения в случае 3a, 3b и 6a 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. k-37635: 1 – original accession from ICARDA (Syria); 2 – Ekaterininskaya Experiment Station (Russia), 2022; 3a, 3b, 3c – Pushkin, Russia, 2016 (greenhouse); 4, 5, Pushkin (field). k-37634: 6a, 6b, Adler Experiment Station (Russia), 2020; 7 – Pushkin, 2016, (greenhouse). 8 – *G* – soybean **(***Glycine max)* k-5950. Extracts for the three isolation methods 3a, 3b and 6a were obtained from the same three seeds.

Экстракция белков с 5% 2-меркаптоэтанолом с нагреванием при 100°С (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).

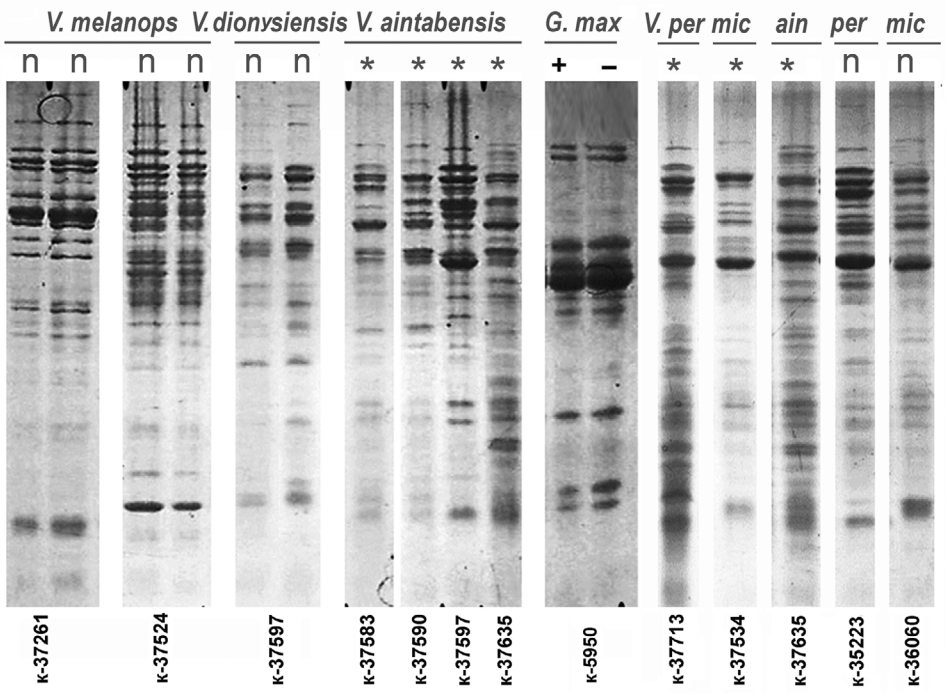


Рис. 6. SDS-электрофорез белков семян образцов видов вики – представителей секции *Peregrinae* и видов других секций.

Экстракты при выделении белков были прогреты при 100°С 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°С 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°С 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 применения. 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°С 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°С 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 *Peregeinae* 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. Gavrilyuk (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).

Eggy E.E. Electrophoresis of seed proteins for the cultivar identification of high polimorphing 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 Yubileinaya 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. Peterburg: 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 легумаинов Asn-специфичных 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/actascibiolsci.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 Al.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 Al.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 Ал.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, Vicieae) *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, Vicieae). *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 dvuukosnyy" 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 двуукосный. *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-Khouri 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., Głowacka 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., Manteufeel 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). V.G. Konarev (ed.). Leningrad: VIR; 1990. [in Russian] (Идентификация сортов гороха методом электрофореза белков семян: методические указания / сост.: А.Н. Тарлаковская , 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.

Научная статья
УДК 634.11:632.4
DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o1

(cc) BY

Поиск генов устойчивости к болезням томата с использованием молекулярных маркеров для создания новых генотипов

И. Н. Шамшин[1], А. С. Ильичев[1], М. Г. Фомичева[2], Е. В. Грошева[1]

[1]Мичуринский государственный аграрный университет, Мичуринск, Россия

[2]Федеральный научный центр овощеводства, Московская область, Россия

Автор, ответственный за переписку: Иван Николаевич Шамшин, ivan_shamshin@mail.ru

Актуальность. Создание сортов и гибридов томата с комплексом генов устойчивости к основным болезням является основной задачей селекционера. Ускорить их получение позволяет применение молекулярных маркеров на стадиях отбора исходных форм и анализа потомства. В литературе имеется большой объем информации о ДНК-маркерах генов устойчивости. Значительная часть рекомендована для использования в маркер-опосредованной селекции. Целью нашей работы был скрининг коллекции сортов и гибридов томата с использованием молекулярных маркеров генов устойчивости к наиболее распространенным болезням томата открытого грунта – фитофторозу, корневым нематодам, вирусу бронзовости – и идентификация источников генов для селекционной работы. Для исследований отобраны маркеры: гена устойчивости к вирусу бронзовости *Sw-5b* – Sw-5-2 гена устойчивости к галловой нематоде *Mi1.2* – Mi23 и 2 маркера гена устойчивости к фитофторозу *Ph-3* – NC-LB-9-78 и NC-LB-9-79. В ходе работы проанализирована коллекция из 46 образцов сортов и гибридов томата. **Результаты.** В результате проведения молекулярно-генетического анализа получены четкие воспроизводимые фрагменты, соответствующие ожидаемым. Все используемые маркеры были кодоминантыми. Анализ коллекционных образцов показал наличие в них полиморфизма по анализируемым генам. Выявлены перспективные для селекции сорта и гибриды томата по устойчивости к корневым нематодам (гибриды F_1: А-01, ‘Имитатор’, ‘Манон’, сорта: ‘Элегия’ и ‘Буй-Тур’), к вирусу бронзовости (гибриды F_1: А-01, ‘Манон’ и сорт ‘Буй-Тур’), а также фитофторозу (гибриды F_1: А-01, ‘Ажур’, ‘Барин’, ‘Властелин степей’, ‘Жирдяй’, Лучший СеДеК, ‘Манон’, сорта: ‘Буй-Тур’, ‘Зефир в шоколаде’, ‘Золотая капля’, ‘Красавец’, ‘Лодочка’, ‘Метелица’, ‘Мечта Алисы’, ‘Сибирский тигр’, ‘Славянский шедевр’, ‘Элегия’). Данные сорта и гибриды целесообразно использовать в качестве источников генов устойчивости. На основании полученных данных отобрано пять исходных форм для селекции. Проведена оценка их внутрисортового полиморфизма по исследуемым генам. В качестве родительских форм были использованы сорта ‘Красавец’ и ‘Сибирский тигр’. Проведена их гибридизация и получены гибридные формы гомозиготные по доминантному аллелю гена *Ph-3*. **Заключение.** Проведенные исследования позволили оценить коллекцию сортов и гибридов томата по наличию генов устойчивости к наиболее распространенным болезням с использованием молекулярных маркеров. На основании полученных данных отобраны родительские пары, проведена гибридизация и получены гибридные формы с геном устойчивости к фитофторозу.

***Ключевые слова*:** маркер-опосредованная селекция, ДНК-маркер, нематоды, вирус бронзовости, *Phytophthora infestans*

Благодарности: работа выполнена в рамках НИР Министерства науки и высшего образования РФ № 122021800376-2

Для цитирования: Шамшин И.Н., Ильичев А.С., Фомичева М.Г., Грошева Е.В. Поиск генов устойчивости к болезням томата с использованием молекулярных маркеров для создания новых генотипов. *Биотехнология и селекция растений.* 2024;7(3):19-30. DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o1

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.

© Шамшин И.Н., Ильичев А.С., Фомичева М.Г., Грошева Е.В., 2024

Original article
DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o1

A search for tomato disease resistance genes using molecular markers to create new genotypes

Ivan N. Shamshin[1], Alexey S. Ilyichev[1], Maria G. Fomicheva[2], Ekaterina. V. Grosheva[1]

[1]Michurinsk State Agrarian University, Michurinsk, Russia

[2]Federal Scientific Vegetable Center, Moscow Region, Russia

Corresponding author: Ivan N. Shamshin, ivan_shasmhin@mail.ru

Background. The creation of tomato cultivars and hybrids with a complex of resistance genes is the main task of a breeder. This process can be accelerated through the use of molecular markers at the stages of initial forms selection and the offspring analysis. There is a large amount of information in the literature about DNA markers of resistance genes. Their significant part was recommended for the use in marker-assisted breeding. The purpose of our work was to screen a collection of tomato varieties and hybrids using molecular markers of genes for resistance to the most common diseases of open-ground tomato (late blight, root nematodes, tomato bronzing virus (TSWV)) and to identify gene sources for breeding work. The following markers were selected for research: Sw-5-2 (*Sw-5b* gene of resistance to TSWV), Mi23 (*Mi1.2* gene of resistance to the root-knot nematode), 2 markers NC-LB-9-78 and NC-LB-9-79 (late blight resistance gene *Ph-3*). During the work, a collection of 46 accessions of tomato cultivars and hybrids was analyzed. **Results**. The molecular genetic analysis has yielded clear, reproducible fragments that corresponded to the expected ones. All the used markers were codominant. Analysis of the studied collection accessions found the analyzed genes to be polymorphic. The cultivars and hybrids F_1 of tomato identified as promising for the use in breeding have resistance to root nematodes (F_1 hybrids: A-01, 'Imitator', 'Manon', cultivars 'Elegiya' and 'Buoy-Tur'), to tomato spotted wilt virus (TSWV) (F1 hybrids: A-01, 'Manon' and cultivar 'Buoy-Tur'), and also to late blight (hybrids F_1: A-01, 'Azhur', 'Barin', 'Vlastelin stepej', 'Zhirdyaj', Luchshij SeDeK, 'Manon' and cultivars: 'Buoy-Tur', 'Zefir v shokolade', 'Zolotaya kaplya', 'Krasavec', 'Lodochka', 'Metelitsa', 'Alice's Dream', 'Sibirskij tigr', 'Slavyanskij shedevr', 'Elegiya'). It is advisable to use these accessions as sources of resistance genes. Based on the obtained data, five initial forms were selected for breeding and assessed for the intracultivar polymorphism of the studied genes. Cultivars 'Krasavec' and 'Sibirskij tigr' were used as parent forms. Their hybridization was carried out and hybrid forms homozygous for the dominant allele of the *Ph-3* gene were obtained. **Conclusions**. The use of molecular markers in the conducted study allowed screening the collection of tomato varieties and hybrids for the presence of resistance genes to the most common diseases. Based on the obtained data, parental pairs were selected, hybridization carried out, and hybrid forms with the late blight resistance gene obtained.

Keywords: marker-assisted selection, DNA marker, nematodes, tomato bronzing virus, *Phytophthora infestans*.

Acknowledgements: the work was carried out within the framework of research No. 122021800376-2 of the Ministry of Higher Education and Science of the Russian Federation.

For citation: Shamshin I.N., Ilyichev A.S., Fomicheva M.G., Grosheva E.V. A search for tomato disease resistance genes using molecular markers to create new genotypes. *Plant Biotechnology and Breeding.* 2024;7(3):19-30. DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o1

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.

© Shamshin I.N., Ilyichev A.S., Fomicheva M.G., Grosheva E.V., 2024

Введение

Томат *Solanum lycopersicum* L. является одной из самых распространенных овощных культур в мире. Ежегодно выращивается около 170 млн тонн плодов томата. Они используются как для потребления в свежем виде, так и для переработки. Значительную долю продукции составляют томаты открытого грунта.

В сельскохозяйственном производстве томат выращивают как однолетнюю овощную культуру (Petrov et al., 2019). Для обеспечения высоких показателей урожайности возделываемые формы должны соответствовать ряду требований, одним из которых, является устойчивость к патогенам. Быстро меняющиеся климатические условия способствуют широкому распространению вредоносных заболеваний. На сегодняшний день установлено, что растения томата поражают порядка 200 вредителей и болезней (Shneyder et al., 2021). Для создания форм с комплексом ценных признаков требуется объединение в одном генотипе нескольких генов устойчивости. Успешному решению данной задачи способствует применение современных методов молекулярной генетики. Использование ДНК-маркеров позволяет значительно сократить сроки селекции.

Вирусные заболевания – ограничивающий фактор овощеводства. Защита растений от вирусных возбудителей болезней является самой трудной и основывается только на сочетании мер борьбы (Vabishchevich, 2021). Одним из наиболее опасных вирусов, поражающих томат, является вирус пятнистого увядания, или вирус бронзовости томата (*Tomato spotted wilt virus,* TSWV). По различным данным возбудитель способен поражать от 271 до 900 видов растений. Заболевание проявляется в виде кольцевых пятнистостей, системного увядания, опадения цветков. Это приводит к угнетению растения и значительному снижению урожайности (Shneyder et al., 2021). Главным переносчиком возбудителя являются трипсы (Thysanoptera: Thripidae Stevens*).* На данный момент известно несколько генов резистентности (*Sw1a*, *Sw1b*, *Sw2*, *Sw3*, *Sw4*, *Sw-5*, *Sw-6* и *Sw-7*) (Shi et al., 2011), идентифицированных у различных дикорастущих видов томата (Soler et al., 2003). Однако устойчивость, обусловленная частью данных генов, считается преодоленной. Наибольшее значение для селекции представляет ген *Sw-5*. Это единственный доминантный ген, отвечающий за устойчивость к широкому спектру видов тосповирусов и действие которого еще не преодолено. Его наличие в генотипе способствует ограничению системного распространения заболевания у растения, поражаются лишь локальные зоны.

Sw-5 находится внутри сложного кластера, состоящего из пяти связанных генов-паралогов, получивших названия от *Sw-5a* до *Sw-5e*. Эффективность каждой копии недостаточно ясна, но анализ отдельных копий в трансгенных растениях показал, что наибольшее фенотипическое проявление признака устойчивости характерно для *Sw-5b* (Dianese et al., 2010). Для идентификации гена *Sw-5* созданы различные типы молекулярных маркеров, такие как RFLP-маркеры CT71 и CT220 (Stevens et al., 1995), маркеры RAPD (Chagué et al., 1996), SSR-маркеры (Pidigam et al., 2021), SCAR-маркеры (Chagué et al., 1996; Nascimento et al., 2009), CAPS-маркеры (Garland et al., 2005, Panthee et al., 2013), а также маркеры In-Del (Dianese et al., 2010) и SNP-маркеры (Shi et al., 2011, Lee et al., 2015). Наиболее распространенным является маркер Sw-5-2, который применяют в селекционной работе (Han et al., 2012, Basim et al., 2019).

Другим важным фактором снижения урожайности у томата являются различные виды нематод. Одним из них является корневая нематода (*Meloidogyne* Goeldi). Основной признак поражения томатов данным вредителем – наличие корневых вздутий, внутри которых находятся личинки и яйца нематод. Они препятствуют образованию новых корней, уменьшают всасывающую поверхность, что приводит к отставанию растений в росте, снижению количества и качества плодов. Недобор урожая при этом составляет от 30 до 50%. Борьба с галловыми нематодами затруднена из-за их высокой пластичности. При благоприятных погодных условиях они могут давать до 8 поколений в год (Dolmatov, 2005).

Устойчивость томата к корневым нематодам впервые выявлена у дикорастущего вида *Solanum peruvianum* L. Установлено, что данный признак контролируется генами семейства *Mi* (*Mi-1*, *Mi-2*, *Mi-3*, *Mi4*, *Mi-5*, *Mi-6*, *Mi-7*, *Mi-8*, *Mi-9*, и *Mi-Ht*). В селекции наиболее часто используют ген *Mi-1*, локализованный на хромосоме 6. Он обеспечивает устойчивость к трем основным видам корневых нематод, поражающих томат: *M. arenaria* Neal, *M. incognita* Kofoid & White и *M. javanica* Treub (Reddy et al., 2018).

Первоначально для идентификации гена *Mi-1* томата применяли изоферментные маркеры, например Aps-1 (Tanksley et al., 1982). Однако более достоверные результаты удалось получить благодаря ДНК-маркерам. Были разработаны различные CAPS-маркеры. Наиболее широко из данного типа маркеров использовался маркер Rex-1 гена *Mi-1* (Williamson et al., 1994). Однако дальнейшие исследования показали, что он дает ложноположительные результаты (El Mehrach et al., 2005). Это послужило основой для поиска более надежных маркеров для ускоренного отбора устойчивых форм. Наиболее успешно зарекомендовали себя кодоминантные маркеры SCAR, например, маркер Mi23 (Seah et al., 2007, Panthee et al., 2015, Devran et al., 2016). В 2016 году на основе этого маркера был разработан и успешно апробирован KASP-маркер гена *Mi1.2* (Devran et al., 2016).

Для томата открытого грунта наибольший ущерб наносят грибные болезни. Одной из самых распространенных является фитофтороз. Его возбудитель *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary поражает все части растения. Основные симптомы заболевания – образование водянистых некрозов бурого цвета на листьях, стебле

и плодах томата. Поражение может появляться на протяжении всего вегетационного периода. Борьба с возбудителем является очень сложной в связи с высоким уровнем его генетической изменчивости, что связано с наличием полового размножения. Известны несколько рас фитофторы. Часть изолятов достаточно агрессивна и обладает устойчивостью к высокоэффективным фунгицидам (Park et al., 2013).

Генетическая устойчивость к фитофторозу вызывает интерес на протяжении многих лет. Впервые гены устойчивости были обнаружены у дикорастущего вида томата *S. pimpinellifolium* L. Предполагают наличие пяти генов устойчивости. В селекционной работе наиболее распространенными являются гены *Ph-1*, *Ph-2* и *Ph-3*. Ген *Ph-1*, локализованный на хромосоме 7, обеспечивает устойчивость к расе T0 возбудителя. Однако действие его было преодолено относительно быстро новой расой T1. Частичную устойчивость к отдельным изолятам этой расы обеспечивает ген *Ph-2*, локализованный на хромосоме 10. Он способствует остановке развития заболевания, но полную устойчивость не дает (Panthee et al., 2015).

Высокий уровень устойчивости к возбудителю фитофтороза показывают растения томата с геном *Ph-3*. Ген впервые картирован на хромосоме 9 у *S. pimpinellifolium* L3708. Этот ген в доминантном гомозиготном состоянии обеспечивает устойчивость к болезни в регионах с относительно простой структурой популяции возбудителя. Он кодирует CC-NBS-LRR (coiled-coil- nucleotide-binding-site-leucine-rich repeat) – белок, который принадлежит к обширному классу NBS-LRR растительных R-генов. Однако в отдельных случаях его действие преодолевается местными агрессивными изолятами фитофторы (Nowicki et al., 2012). Сообщалось также о расовых неспецифических генах, обеспечивающих умеренную и длительную устойчивость к целому ряду изолятов (Park et al., 2013). Наибольшую степень защиты от болезни дает объединение в одном генотипе нескольких генов устойчивости, например *Ph-2* и *Ph-3* (Panthee et al., 2015).

С целью идентификации генов устойчивости к фитофторозу был проведен поиск ДНК-маркеров для применения в селекционной работе. Значительная часть исследований была сосредоточена на создании кодоминантных SCAR (Park et al., 2013, Zhang et al., 2013, Truong et al., 2013, Ren et al., 2019) и CAPS-маркеров (Wang et al., 2016). Благодаря им были созданы новые формы томата с несколькими генами устойчивости к фитофторозу (Panthee et al., 2015). Использование молекулярных маркеров дает возможность пирамидирования генов резистентности к различным возбудителям болезней в короткие сроки. На сегодняшний день создано большое количество ДНК-маркеров. Многие из них успешно применяются для анализа исходных форм и гибридного потомства.

Целью нашей работы был скрининг коллекции сортов и гибридов томата с использованием молекулярных маркеров генов устойчивости к наиболее распространенным болезням томата открытого грунта (фитофтороз, корневые нематоды, вирус бронзовости) и идентификация источников генов для селекционной работы.

Материалы и методы

Работа выполнена на базе лаборатории молекулярно-генетического анализа плодовых растений Мичуринского ГАУ. Биологическими объектами исследования были 46 сортов и гибридов томата из коллекции университета (табл. 2). В качестве положительного контроля устойчивости к вирусу бронзовости томата и галловой нематоде использовали гибрид F_1 томата ‘Манон’. Для контроля устойчивости к фитофторозу использовали сорт ‘Красавец’ селекции Мичуринского ГАУ.

Экстрагирование ДНК проводили из молодых листьев томата с использованием набора «Проба-НК» (Агродиагностика, Россия) в соответствии с протоколом производителя.

Для работы были использованы молекулярные маркеры генов устойчивости: к вирусу бронзовости (TSWV) Sw-5-2 (Dianese et al., 2010) (ген *Sw-5b*), к галловой нематоде Mi23 (Seah et al., 2007) (ген *Mi1.2*), два маркера NC-LB-9-78 и NC-LB-9-79 (Panthee et al., 2015) гена устойчивости к фитофторозу *Ph-3*.

Для подбора родительских пар была проведена оценка внутрисортового полиморфизма части коллекционных образцов. Для работы были отобраны пять сортов: ‘Красавец’, ‘Буй-Тур’, ‘Сибирский тигр’, ‘Сокол’, ‘Орлик’. Проанализировано по 10 растений томата каждого сорта с маркерами Mi23, Sw-5-2, NC-LB-9-6678.

Нуклеотидные последовательности используемых праймеров приведены в таблице 1.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, используемых в работе

Table 1. The nucleotide sequences of the primer pairs used in the work

Название маркера/ Marker name	Последовательность прямого праймера/ Forward primer sequence (5'→ 3')	Последовательность обратного праймера/ Reverse primer sequence (5'→ 3')
Sw-5-2	AATTAGGTTCTTGAAGCCCATCT	TTCCGCATCAGCCAATAGTGT
Mi23	TGGAAAAATGTTGAATTTCTTTTG	GCATACTATATGGCTTGTTTACCC
NC-LB-9-6678	CCTTAATGCAATAGGCAAAT	ATTTGAATGTTCTGGATTGG
NC-LB-9-6679	TCGGCTTATAGAAAAGCAAC	CGGAGAACAGTTTTGAACTC

Реакционная смесь для ПЦР со всеми праймерами объемом 15 мкл содержала: 20 нг ДНК, 1,5 мМ dNTP, 2,5 мМ $MgSO_4$, 10 пМ каждого праймера, 1 ед. Taq-полимеразы и стандартный ПЦР-буфер. Реакцию с использованием соответствующих пар праймеров (см. табл. 1) проводили по следующим программам для исследуемых маркеров:

Sw-5-2 – 3 мин 94°C, 35 циклов [30 с 94°C, 1 мин 50°C, 30 с 72°C], 5 мин 72°C;

Mi23 – 5 мин 95°C, 35 циклов [20 с 95°C, 20 с 62°C, 30 с 72°C], 2 мин 72°C;

NC-LB-9-6678 и **NC-LB-9-6679** – 3 мин 92°C, 35 циклов [30 с 92°C, 1 мин 52°C, 30 с 72°C], 8 мин 72°C.

Продукты амплификации разделяли путем электрофореза в 2% агарозном геле. После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием и анализировали в ультрафиолетовом свете с использованием трансиллюминатора ETX-F26.M (Vilber Lourmat, Франция).

Результаты

Для поиска источников генов устойчивости томата к вирусу бронзовости, к корневой нематоде и фитофторозу были проанализированы образцы 46 сортов и гибридов (см. табл. 2).

Таблица 2. Сорта и гибриды томата, отобранные для анализа, и данные о разнообразии генов устойчивости

Table 2. Tomato cultivars and hybrids selected for the analysis and the resistance gene diversity data

№	Название сорта или гибрида/ The name of cultivar or hybrid	Маркеры генов устойчивости/ Resistance gene markers							
		Mi23		Sw-5-2		NC-LB-9-6678		NC-LB-9-6679	
		R* 380 **	S 430	R 574	S 464	R 600	S 900	R 1000	S 1200
1	‘Морковный’	-	+	-	+	-	+	-	+
2	‘Шанс’ (F1)	-	+	-	+	-	+	-	+
3	‘Сибирский скороспелый’	-	+	-	+	-	+	-	+
4	‘Джина’	-	+	-	+	-	+	-	+
5	Лучший СеДеК (F1)	-	+	-	+	+	+	+	+
6	‘Барин’ (F1)	-	+	-	+	+	+	+	+
7	‘Тимофеич’	-	+	-	+		+	-	+
8	‘Черная груша’	-	+	-	+		+	-	+
9	‘Жирдяй’ (F1)	-	+	-	+	+	+	+	+
10	‘Имитатор’ (F1)	+		-	+		+	-	+
11	‘Славянский шедевр’	-	+	-	+	+		+	
12	‘Волгоградский’ штамбовый	-	+	-	+	-	+	-	+
13	‘Золотая капля’	-	+	-	+	+		+	
14	‘Элегия’	+	+	-	+	+	+	+	+
15	‘Тамерлан’ (F1)	-	+	-	+	-	+	-	+
16	‘Благородный принц’	-	+	-	+	-	+	-	+
17	‘Черный мавр’	-	+	-	+	-	+	-	+
18	‘Элтон Джон’ (F1)	-	+	-	+	-	+	-	+
19	‘Лодочка’	-	+	-	+	+		+	
20	‘Глаша’	-	+	-	+	-	+	-	+
21	‘Мечта Алисы’/ ’Alice's Dream’	-	+	-	+	+		+	
22	‘Черное сердце Америки’/ ‘American black heart’	-	+	-	+	-	+	-	+
23	‘Синяя груша’	-	+	-	+	-	+	-	+
24	‘Белле’/‘Belle’ (F1)	-	+	-	+	-	+	-	+
25	‘Японский краб’	-	+	-	+	-	+	-	+
26	‘Сибирский тигр’	-	+	-	+	+		+	
27	‘Золотой Кенигсберг’	-	+	-	+	-	+	-	+
28	‘Метелица’	-	+	-	+	+		+	

№	Название сорта или гибрида/ The name of cultivar or hybrid	Маркеры генов устойчивости/ Resistance gene markers							
		Mi23		Sw-5-2		NC-LB-9-6678		NC-LB-9-6679	
		R* 380 **	S 430	R 574	S 464	R 600	S 900	R 1000	S 1200
29	‘Итальянские спагетти’	-	+	-	+	-	+	-	+
30	‘Дар Заволжья’	-	+	-	+	-	+	-	+
31	‘Оранжевые сливки’	-	+	-	+	-	+	-	+
32	‘Рио-Гранде’	-	+	-	+	-	+	-	+
33	‘Зефир в шоколаде’	-	+	-	+	+	+	+	+
34	Карнобель (F1)	-	+	-	+	-	+	-	+
35	Ш-03 (F1)	-	+	-	+	-	+	-	+
36	А-01 (F1)	+	+	+	+	+	+	+	+
37	Ш\1 (F1)	-	+	-	+	-	+	-	+
38	‘Непас 9’	-	+	-	+	+	-	+	-
39	‘Властелин степей’ (F1)	-	+	-	+	+	-	+	-
40	‘Ажур’ (F1)	-	+	-	+	+	+	+	+
41	‘Катенька’ (F1)	-	+	-	+	-	+	-	+
42	‘Орлик’	-	-	-	-	-	-	-	-
43	‘Сокол’	-	-	-	-	-	-	-	-
44	‘Буй-Тур’	+	-	+	-	+	-	+	-
45	‘Манон’ (F1)	+	+	+	+	+	+	+	+
46	‘Красавец’	-	+	-	+	+	-	+	-

Примечания:
*R (от англ. resistance) – маркер аллеля устойчивости, ▭;
S (от англ. susceptibility) – маркер аллеля восприимчивости; ** – размер фрагмента в парах нулеотидов (пн) «+» – наличие фрагмента, «-» – отсутствие фрагмента, отсутствие «+» или «-» – нет данных

Для идентификации гена *Mi1.2* устойчивости к корневой нематоде был использован кодоминантный SCAR маркер Mi23. Он позволяет выявить два фрагмента размером 380 пн и 430 пн. Наличие фрагмента 380 пн характерно для устойчивых образцов и свидетельствует о присутствии доминантного аллеля гена (Seah et al., 2007).

Фрагмент размером 380 пн был выявлен у четырех образцов – у гибридов F_1 – А-01, ‘Имитатор’, ‘Манон’, а также у сортов ‘Элегия’ и ‘Буй-Тур’ (рис. 1) (см. табл. 2).

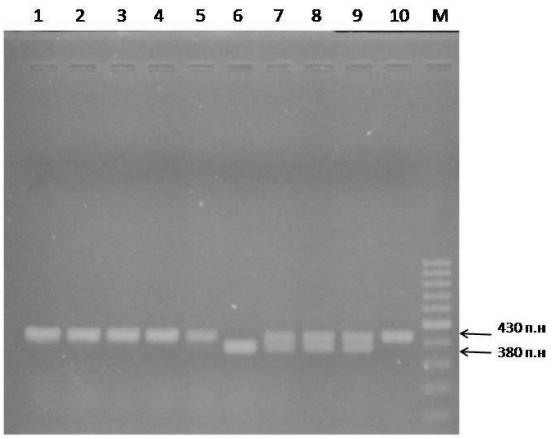


Рис. 1. Результаты идентификации гена *Mi1.2* у образцов гибридов F_1 и сортов томата
1 – ‘Морковный’, 2 – ‘Шанс’, 3 – ‘Сибирский скороспелый’, 4 – ‘Джина’, 5 – ‘Дар Заволжья’, 6 – ‘Имитатор’, 7 – ‘Элегия’, 8 – А-01, 9 – ‘Манон’, 10 – ‘Черный мавр’, М – маркер размера фрагментов ДНК (шаг 100 пн)

Fig. 1. Results of the *Mi1.2* gene identification in tomato F_1 hybrid and cultivar accessions
1 – ‘Morkovnyj’, 2 – ‘Shans’, 3 – ‘Sibirskij skorospelyj’, 4 – ‘Dzhina’, 5 – ‘Dar Zavolzh'ya’, 6 – ‘Imitator’, 7 – ‘Elegiya’, 8 – A-01, 9 – ‘Manon’, 10 – ‘Chernyj mavr’, M – DNA fragment size marker (step 100 bp)

При этом ‘Имитатор’ и ‘Буй-Тур’ являются доминантными гомозиготами, так как у них идентифицирован только фрагмент 380 пн. Остальные образцы имели оба фрагмента и, следовательно, были гетерозиготами по гену *Mi1.2* устойчивости к корневой нематоде. Большая часть образцов имела только рецессивный аллель (см. табл. 2).

Для определения сочетания аллелей гена *Sw-5* устойчивости к вирусу бронзовости томата был применен маркер Sw-5-2. При проведении ПЦР с использованием праймеров для этого маркера синтезируются три фрагмента размером 574 пн, 510 пн и 464 пн. Первый фрагмент характерен для устойчивых образцов, второй и третий фрагменты – для восприимчивых (Dianese et al., 2010).

Анализ результатов амплификации показал наличие двух из трех ожидаемых фрагментов. Фрагмент размером 574 пн идентифицирован у трех образцов – гибрида А-01, сорта ‘Буй-Тур’ и контрольного образца ‘Манон’ (см. табл. 2). Остальные образцы имели фрагмент размером 464 пн (рис. 2).

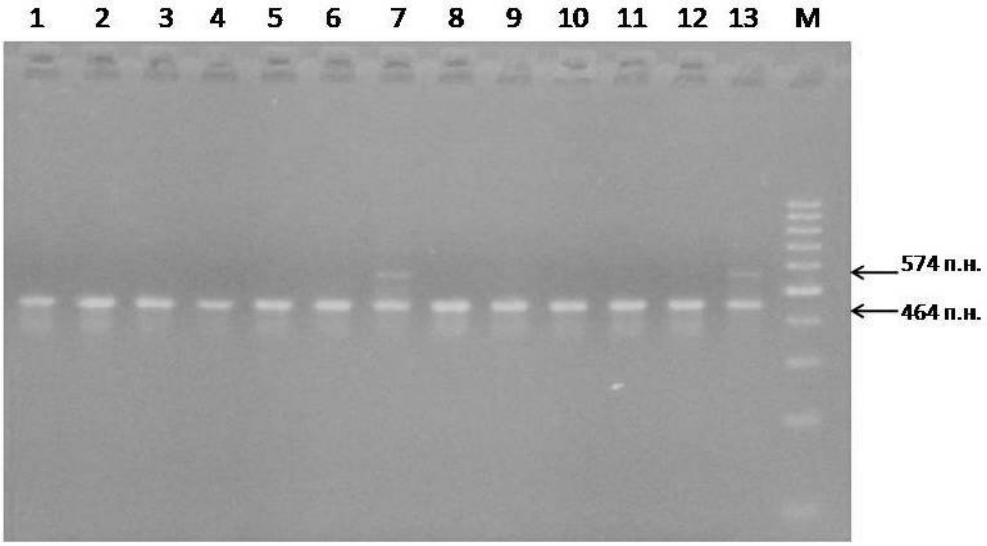


Рис. 2. Результаты идентификации гена *Sw-5* у гибридов F_1 и сортов томата
1 – ‘Дар Заволжья’, 2 – ‘Оранжевые сливки’, 3 – ‘Рио-Гранде’, 4 – ‘Зефир в шоколаде’, 5 – Карнобель, 6 – Ш-03, 7 – А-01, 8 – Ш/1, 9 – ‘Непас 9’, 10 – ‘Властелин степей’, 11 – ‘Ажур’, 12 – ‘Катенька’, 13 – ‘Манон’, М – маркер размера фрагментов ДНК (шаг 100 пн)

Fig. 2. Results of the *Sw-5* gene identification in tomato F_1 hybrids and cultivars
1 – ‘Dar Zavolzh'ya’, 2 – ‘Oranzhevye slivki’, 3 – ‘Rio-Grande’, 4 – ‘Zefir v shokolade’, 5 – Karnobel, 6 – SH-03, 7 – A-01, 8 – SH/1, 9 – ‘Nepas 9’, 10 – ‘Vlastelin stepej’, 11 – ‘Azhur’, 12 – ‘Katen’ka’, 13 – ‘Manon’, M – DNA fragment size marker (step 100 bp)

Для идентификации устойчивости коллекционных образцов томата к фитофторозу использовали маркеры NC-LB-9-6678 и NC-LB-9-6679. Оба маркера позволяют идентифицировать ген *Ph-3*.

В результате анализа с использованием праймеров для маркера NC-LB-9-6678 были выявлены два фрагмента размером 600 пн и 900 пн, что соответствует ожидаемому результату (Panthee et al., 2015). Для устойчивого образца характерно наличие фрагмента 600 пн, а для восприимчивого – 900 пн (рис. 3).

Среди анализируемых коллекционных образцов отмечены гетерозиготные образцы (8), доминантные гомозиготные формы (12), а также рецессивные гомозиготы (24) (см. табл. 2). Фрагмент, соответствующий аллелю устойчивости, в гомозиготном состоянии идентифицирован у контрольного образца – сорта ‘Красавец’.

Для уточнения результатов о наличии гена *Ph-3* у коллекционных образцов томата был использован второй ДНК-маркер NC-LB-9-6679. В результате электрофоретической разгонки продуктов амплификации получены фрагменты с ожидаемым размером 1000 пн (устойчивый аллель) и 1200 пн (восприимчивый аллель) (рис. 4).

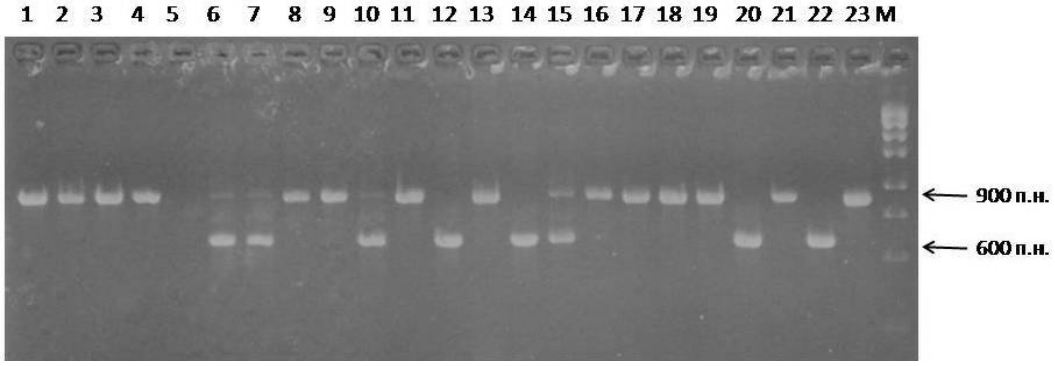


Рис. 3. Результаты идентификации гена *Ph-3* у образцов гибридов F_1 и сортов томата с использованием маркера NC-LB-9-6678

1 – ‘Морковный’, 2 – ‘Шанс’, 3 – ‘Сибирский скороспелый’, 4 – ‘Джина’, 5 – ‘Дар Заволжья’, 6 – Лучший СеДеК, 7 – ‘Барин’, 8 – ‘Тимофеич’, 9 – ‘Черная груша’, 10 – ‘Жирдяй’, 11 – ‘Имитатор’, 12 – ‘Славянский шедевр’, 13 – ‘Волгоградский’ штамбовый, 14 – ‘Красавец’, 15 – ‘Элегия’, 16 – ‘Тамерлан’, 17 – ‘Благородный принц’, 18 – ‘Черный мавр’, 19 – ‘Элтон Джон’, 20 – ‘Лодочка’, 21 – ‘Глаша’, 22 – ‘Мечта Алисы’, 23 – ‘Черное сердце Америки’, M – маркер размера фрагментов ДНК (минимальный размер фрагмента 250 пн)

Fig. 3. Results of the *Ph-3* gene identification in tomato F_1 hybrid and cultivar accessions using the marker NCLB-9-6678

1 – ‘Morkovnyj’, 2 – ‘Shans’, 3 – ‘Sibirskij skorospelyj’, 4 – ‘Dzhina’, 5 – ‘Dar Zavolzh'ya’, 6 – Luchshij SeDeK, 7 – ‘Barin’, 8 – ‘Timofeich’, 9 – ‘Chernaya grusha’, 10 – ‘Zhirdyaj’, 11 – ‘Imitator’, 12 – ‘Slavyanskij shedevr’, 13 – ‘Volgogradskij’ shtambovyj, 14 – ‘Krasavec’, 15 – ‘Elegiya’, 16 – ‘Tamerlan’, 17 – ‘Blagorodnyj princ’, 18 – ‘Chernyj mavr’, 19 – ‘Elton Dzhon’, 20 – ‘Lodochka’, 21 – ‘Glasha’, 22 – ‘Alice's Dream’, 23 – ‘Chernoe serdce Ameriki’, M – DNA fragment size marker (minimum fragment size 250 bp).

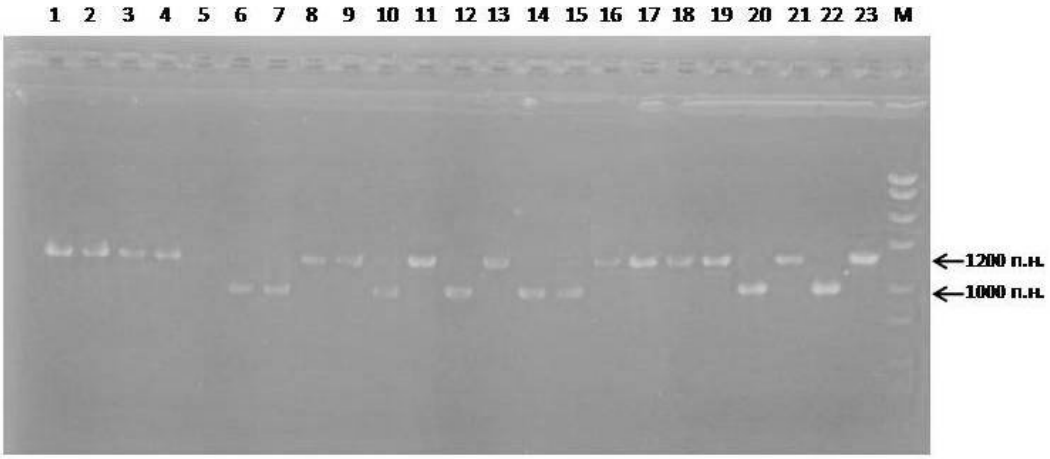


Рис. 4. Результаты идентификации гена *Ph-3* у образцов гибридов F_1 и сортов томата с использованием маркера NC-LB-9-6679

1 – ‘Морковный’, 2 – ‘Шанс’, 3 – ‘Сибирский скороспелый’, 4 – ‘Джина’, 5 – ‘Дар Заволжья’, 6 – Лучший СеДек, 7 – ‘Барин’, 8 – ‘Тимофеич’, 9 – ‘Черная груша’, 10 – ‘Жирдяй’, 11 – ‘Имитатор’, 12 – ‘Славянский шедевр’, 13 – ‘Волгоградский’ штамбовый, 14 – ‘Красавец’, 15 – ‘Элегия’, 16 – ‘Тамерлан’, 17 – ‘Благородный принц’, 18 – ‘Черный мавр’, 19 – ‘Элтон Джон’, 20 – ‘Лодочка’, 21 – ‘Глаша’, 22 – ‘Мечта Алисы’, 23 – ‘Черное сердце Америки’, M – маркер размера фрагментов ДНК (минимальный размер фрагмента 250 пн)

Fig. 4. Results of the *Ph-3* gene identification in tomato F_1 hybrid and cultivar accessions using the marker NCLB-9-6679

1 – ‘Morkovnyj’, 2 – ‘Shans’, 3 – ‘Sibirskij skorospelyj’, 4 – ‘Dzhina’, 5 – ‘Dar Zavolzh'ya’, 6 – Luchshij SeDeK, 7 – ‘Barin’, 8 – ‘Timofeich’, 9 – ‘Chernaya grusha’, 10 – ‘Zhirdyaj’, 11 – ‘Imitator’, 12 – ‘Slavyanskij shedevr’, 13 – ‘Volgogradskij shtambovyj’, 14 – ‘Krasavec’, 15 – ‘Elegiya’, 16 – ‘Tamerlan’, 17 – ‘Blagorodnyj princ’, 18 – ‘Chernyj mavr’, 19 – ‘Elton Dzhon’, 20 – ‘Lodochka’, 21 – ‘Glasha’, 22 – ‘Alice's Dream’, 23 – ‘Chernoe serdce Ameriki’, M – DNA fragment size marker (minimum fragment size 250 bp)

Проведена оценка внутрисортового полиморфизма сортов ‘Красавец’, ‘Буй-Тур’, ‘Сибирский тигр’, ‘Сокол’, ‘Орлик’.

Результаты анализа электрофоретических спектров продуктов ПЦР с маркером Mi23 гена *Mi1.2* устойчивости к нематодам показали, что все десять растений сортов ‘Сокол’, ‘Красавец’, ‘Сибирский тигр’ и ‘Орлик’ являются рецессивными гомозиготными формами и не имеют фрагмента размером 380 пн, соответствующего доминантному аллелю устойчивости. Исключение составляет сорт ‘Буй-Тур’, который гомозиготен по доминантному аллелю (рис. 5).

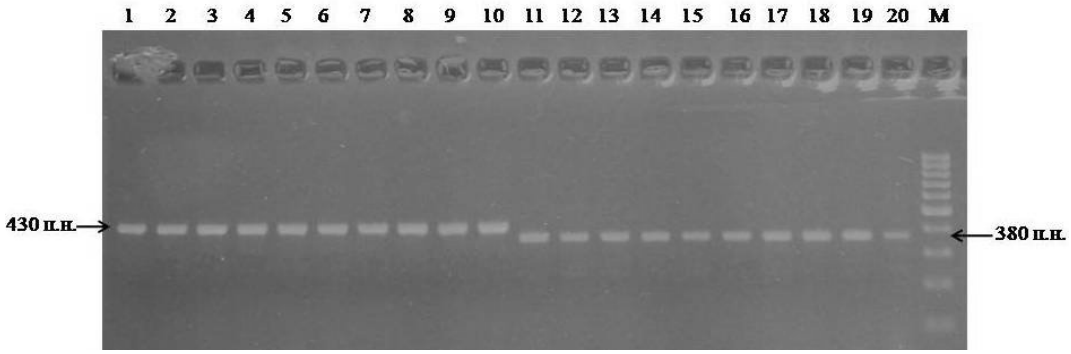


Рис. 5. Результаты оценки внутрисортового полиморфизма сортов томата ‘Красавец’ и ‘Буй-Тур’ по гену *Mi1.2*

1-10 – образцы сорта ‘Красавец’, 11-20 – образцы сорта ‘Буй-Тур’, М – маркер размера фрагментов ДНК (шаг 100 пн).

Fig. 5. The results of the intracultivar *Mi1.2* gene polymorphism assessment in tomato cultivars ‘Krasavec’ and ‘Buoy-Tour’

1-10 – cv. ‘Krasavec’ specimens, 11-20 cv. ‘Buoy-Tur’ specimens, M – DNA fragment size marker (step 100 bp).

Аналогичная картина наблюдается при анализе полиморфизма по гену *Sw-5b* устойчивости к вирусу бронзовости томата. Четыре сорта – ‘Сокол’, ‘Красавец’, ‘Орлик, ‘Сибирский тигр’ – мономорфны и являются гомозиготными по рецессивному аллелю, имеют только фрагмент 464 пн. У сорта ‘Буй-Тур’ идентифицирован только фрагмент 574 пн, что говорит о его гомозиготности по доминантному аллелю.

Для анализа сортов селекции Мичуринского ГАУ по гену устойчивости к фитофторозу *Ph-3* был использован маркер NC-LB-9-6678. Совпадение результатов по маркерам NC-LB-9-6678 и NC-LB-9-6679, выявленное при анализе коллекционных образцов, подтверждает возможность использования только одного из маркеров. В результате проведенной работы показано, что у сортов ‘Сибирский тигр’, ‘Красавец’, ‘Буй-Тур’ и ‘Сокол’ идентифицирован только фрагмент, соответствующий аллелю устойчивости. У сорта ‘Орлик’ выявлен фрагмент размером 900 пн, что говорит о том, что он является рецессивной гомозиготой (рис. 6).

Для создания сорта томата с устойчивостью к фитофторозу, обладающего штамбовым типом куста и антоциановой окраской плодов было проведено скрещивание сортов ‘Красавец’ и ‘Сибирский тигр’, являющихся доминантными гомозиготами по гену *Ph-3*.

В результате проведенной гибридизации были получены гибридные формы. Для молекулярного анализа были отобраны 20 растений и проанализированы с использованием маркера NC-LB-9-6678. Установлено, что все анализируемые растения имеют только доминантный аллель в гомозиготном состоянии.

Обсуждение

Полученные в ходе работы результаты позволили оценить коллекцию сортов и гибридов томата. С использованием молекулярных маркеров выявлены источники генов ценных признаков. Все применённые в работе маркеры ранее были использованы для анализа различных коллекций сортов и гибридов томата. Например, маркер Mi23 является одним из часто используемых маркеров для определения наличия гена *Mi1.2*. С его помощью анализируют гибриды и линии томата, что говорит о его эффективности (Seah et al., 2007; Devran et al., 2016; Basim et al., 2019; Kaur et al., 2019; Shihab et al., 2019). Ген *Mi1.2*. часто используют в селекционной работе, он характеризует многие образцы в коллекциях томата (Kaur et al., 2019; El-Sappah et al., 2022). В сравнении с другими маркерами Mi23 показывает стабильные результаты и способен выявлять полиморфизм. Установлено, что в нашей коллекции доминантный аллель гена устойчивости *Mi1.2* выявлен только у четырех образцов из изученных 46.

Маркер Sw-5-2 также показал возможность выявления в коллекции полиморфизма по гену *Sw-5* устойчивости к вирусу бронзовости. С его помощью возможно провести оценку образцов томата на наличие гомозиготных

форм как по доминантному, так и по рецессивному аллелю, равно как и гетерозигот. Такие результаты получены корейскими исследователями при изучении коллекции из 94 образцов томата (Han et al., 2012). Аналогичные результаты получены в работе H. Basim и коллег (Basim et al., 2019) Проведена апробация данного маркера и на дикорастущих видах. Более 10 видов томата исследованы с использованием молекулярных маркеров и методом искусственного заражения. В результате отмечено совпадение данных по наличию маркера и признака у образцов (Mahfouze et al., 2022). Однако ряд работ показал, что не всегда наличие данного маркера совпадает с наличием устойчивости. Часть растений, у которых маркер свидетельствовал о наличии аллеля устойчивости, были поражены возбудителем. При этом есть данные, свидетельствующие о том, что работа гена *Sw-5* устойчивости к вирусу бронзовости зависит от температуры внешней среды. При температуре выше 28°С проявление его действия ослабевает и на растении наблюдаются признаки поражения. Также предполагается наличие новых форм возбудителей, способных преодолевать действие гена *Sw-5* (Kabaş et al., 2021). В проводимых нами исследованиях мы опирались на маркерный анализ. Работу по оценке устойчивости при искусственном заражении не проводили, что связано со статусом карантинного объекта вируса бронзовости. У контрольного образца – гибрида F_1 ‘Манон’ идентифицирован аллель устойчивости. Кроме контрольного образца он выявлен лишь у гибрида F_1 А-01 селекции Института сельского хозяйства Крыма и сорта ‘Буй-Тур’ селекции Мичуринского ГАУ. Все остальные образцы имеют только аллель восприимчивости, то есть у большинства образцов анализируемой коллекции аллель устойчивости отсутствует.

Используемые в данном исследовании маркеры NC-LB-9-6678 и NC-LB-9-6679 были успешно использованы другими авторами. Так, в работе О.Г. Бабак и коллег (Babak et al., 2021) данные маркеры были апробированы на коллекции томата, в том числе гибридных линиях из различных научных учреждений Республики Беларусь. Были выделены источники генов устойчивости к фитофторозу, на основе которых созданы новые селекционные формы томата. В исследованиях В.В. Мартынова и коллег (Martynov et al., 2022) также был использован маркер NC-LB-9-6678.

В качестве контрольного образца в наших исследованиях был выбран районированный сорт селекции Мичуринского ГАУ ‘Красавец’, который на протяжении ряда лет проявлял высокую устойчивость к фитофторозу на естественном фоне. Оба маркера NC-LB-9-6678 и NC-LB-9-6679 показали наличие у данного сорта гена в доминантном гомозиготном состоянии. Доминантный аллель гена устойчивости оказался наиболее распространенным в исследуемой коллекции. В гомозиготном доминантном состоянии он обнаружен у 12 из 46 образцов, а в гетерозиготном состоянии у 8 образцов. Вероятно, это связано с продолжительной селекционной работой по созданию устойчивых к фитофторозу форм томата.

Таким образом, была произведена оценка распространения аллелей генов устойчивости в коллекционных образцах томата, что позволило провести отбор источников гена устойчивости для последующего использования в гибридизации. В Мичуринском ГАУ на протяжении ряда лет ведется работа по созданию новых сортов томата со штамбовым типом куста, антоциановой окраской и устойчивостью к грибным болезням. В качестве потенциальных исходных форм из анализируемой коллекции были отобраны сорта ‘Буй-Тур’, ‘Сокол’, ‘Орлик’, ‘Красавец’ в качестве источника штамбового типа растения и сорт ‘Сибирский тигр’ как источник антоциановой окраски. Все сорта были проанализированы с использованием молекулярных маркеров для определения генетической однородности по признакам устойчивости. Установлено, что сорта ‘Красавец’, ‘Буй-Тур’ и ‘Сибирский тигр’ являются гомозиготами по доминантному аллелю гена *Ph-3*. При этом сорт ‘Буй-Тур’ гомозиготен по доминантному аллелю генов *Mi1.2* и *Sw-5b*. Однако сравнение типов куста сортов ‘Красавец’ и ‘Буй-Тур’ показало, что у второго сорта он не соответствует предъявляемым требованиям, а именно имеет более раскидистый куст и склонен к полеганию при высокой урожайности. У сорта ‘Красавец’ куст компактный, мощный, не склонный к полеганию. Поэтому в качестве родительских форм были использованы сорта ‘Красавец’ и ‘Сибирский тигр’. Ожидается, что все полученное потомство должно быть гомозиготным по доминантному аллелю гена *Ph-3*.

От комбинации скрещивания ‘Красавец’ × ‘Сибирский тигр’ получены гибридные растения. Для их оценки было отобрано 20 растений, которые были проанализированы с использованием маркера NC-LB-9-6678. Установлено, что все образцы имели только доминантный аллель гена устойчивости *Ph-3*, что соответствует ожидаемому результату.

Заключение

В ходе исследований проведена оценка коллекции сортов и гибридов томата с использованием молекулярных маркеров генов устойчивости к почвенным нематодам, вирусу бронзовости томата и фитофторозу. С использованием маркера Mi23 (ген *Mi1.2* устойчивости к корневой нематоде) выявлены источники гена ценного признака, а именно гибриды F_1 А-01, ‘Имитатор’, ‘Манон’, а также сорта ‘Элегия’ и ‘Буй-Тур’. Источниками гена устойчивости к вирусу бронзовости являются гибриды А-01, ‘Манон’ и сорт ‘Буй-Тур’. Использование двух маркеров гена *Ph-3* устойчивости к фитофторозу показало аналогичные результаты и позволило идентифицировать аллель устойчивости у образцов гибридов F_1 А-01, ‘Ажур’, ‘Барин’, ‘Властелин степей’, ‘Жирдяй’, Лучший СеДеК, ‘Манон’ и сортов ‘Буй-Тур’, ‘Зефир в шоколаде’, ‘Золотая капля’, ‘Красавец’, ‘Лодочка’, ‘Метелица’, ‘Мечта Алисы’, ‘Сибирский тигр’, ‘Славян-

ский шедевр', 'Элегия'.

На основании полученных данных отобраны пять исходных форм для селекции. Проведена оценка их внутрисортового полиморфизма по исследуемым генам. Проведено скрещивание сортов 'Красавец' и 'Сибирский тигр', получены гибридные формы, гомозиготные по доминантному аллелю гена *Ph-3*.

References/Литература

Babak O.G., Drozd E.V., Nekrashevich N.A., Anisimova N.V., Yatsevich K.K., Bayeva I.E., Pugachova I.G., Frantsuzionak A.V., Dobrodkin M.M., Kilchevsky A.V. Assessment and application of molecular markers in breeding for the resistance of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) to late blight (*Phytophthora infestans*). *Molecular and applied genetics*. 2021;31:22-30. [in Russian] (Бабак О.Г., Дрозд Е.В., Некрашевич Н.А, Анисимова Н.В., Яцевич К.К., Баева И.Е., Пугачева И.Г., Француzенок А.В., Добродькин М.М., Кильчевский А.В. Оценка и применение молекулярных маркеров в селекции на устойчивость томата (*Solanum lycopersicum* L.) к фитофторе (*Phytophthora infestans*) *Молекулярная и прикладная генетика*. 2021;31:22-30). DOI: 10.47612/1999-9127-2021-31-22-30

Dolmatov D.A. Protection of tomato and cucumber crops from root-knot nematodes in protected ground conditions (Zashchita kul'tury tomata i ogurtsa ot gallovykh nematod v usloviyakh zakrytogo grunta). *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian Sciences Series.* 2005;5:123-124. [in Russian] (Долматов Д.А. Защита культуры томата и огурца от галловых нематод в условиях закрытого грунта. *Весцы Нацыянальнай Акадэм Навук Беларуси. Серыя аграрных навук*. 2005;5:123-124).

Basim H., Turgut K., Kaplan B., Basim E., Turgut A. The potential application of *Origanum dubiumboiss* essential oil as a seed protectant against bean and tomato seed-borne bacterial pathogens. *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*. 2019;18(3):79-86. DOI: 10.24326/asphc.2019.3.8

Chagué V., Mercier J.C., Guénard M., De Courcel A., Vedel F. Identification and mapping on chromosome 9 of RAPD markers linked to *Sw-5* in tomato by bulked segregant analysis. *Theoretical and Applied Genetics*. 1996;92:1045-1051. DOI: 10.1007/BF00224047

Devran Z. Göknur A., Mesci L. Development of molecular markers for the *Mi-1* gene in tomato using the KASP genotyping assay. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*. 2016;57:156-160. DOI: 10.1007/s13580-016-0028-6

Dianese E.C. de Fonseca M.E.N., Goldbach R., Kormelink R., Inoue-Nagata A.K., Resende R.O., Boiteux L.S. Development of a locus-specific, co-dominant SCAR marker for assisted-selection of the *Sw-5* (*Tospovirus* resistance) gene cluster in a wide range of tomato accessions *Molecular Breeding*. 2010;25:133-142. DOI: 10.1007/s11032-009-9313-8

El Mehrach K., Gharsall ah Chouchane S., Mejia L., Williamson V.M., Vidavski F., Hatimi A., Maxwell D.P. PCR-based methods for tagging the Mi-1 locus for resistance to root-knot nematode in begomovirus-resistant tomato germplasm. *Acta Horticulturae*. 2005;695:263-270. DOI: 10.17660/ActaHortic.2005.695.29

El-Sappah A.H., Islam M.M., Rather S.A., Li J., Yan K., Xianming Z., Abbas M. Identification of novel root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) resistant tomato genotypes. *Journal of Animal & Plant Sciences*. 2022;32(1):99-113. DOI: 10.36899/JAPS.2022.1.0407

Garland S., Sharman M., Persley D., McGrath D. The development of an improved PCR-based marker system for *Sw-5*, an important TSWV resistance gene of tomato. *Australian Journal of Agricultural Research*. 2005;56(3):285-289. DOI: 10.1071/AR04140

Han J.H., Choi H.S., Lee J.D., Kim J.D., Lee W.P., Choi H.S., Yoon J.B. Screening of tomato spotted wilt virus resistance in tomato accessions. *Horticultural Science and Technology*. 2012;30(2):171-177. DOI: 10.7235/hort.2012.11126

Kabaş A.M.B., Fidan H., Demirelli M.B. Identification of new sources of resistance to resistance-breaking isolates of tomato spotted wilt virus. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021; 28(5):3094-3099. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.02.053

Kaur S., Jindal S.K., Dhaliwal M.S. Resistance potential of indeterminate tomato lines against root knot nematode (*Meloidogyne incognita*). *Agricultural Research Journal*. 2019;56(2):220-225. DOI: 10.5958/2395-146X.2019.00034.6

Lee J.M., Oh C. S., Yeam I. Molecular markers for selecting diverse disease resistances in tomato breeding programs. *Plant Breeding and Biotechnology*. 2015;3:308-322. DOI: 10.9787/PBB.2015.3.4.308

Mahfouze H.A., Mahfouze S.A., Ottai M.E.S. Molecular characterization of markers linked to tomato spotted wilt virus and tomato mosaic virus resistance loci in tomato. *Journal of Applied Biology and Biotechnology*. 2022;10(3):135-144. DOI: 10.7324/JABB.2022.100318

Martynov V.V., Kozar E.G., Engalycheva I.A. Features of the primary structure of the *Ph-3* gene revealed by development of a new gene-based marker of late blight resistance in tomato. *Agricultural Biology*. 2022;57(5):954-964. [in Russian] (Мартынов В.В., Козарь Е.Г., Енгалычева И.А. Особенности первичной структуры гена *Ph-3*, выявленные при создании нового маркера устойчивости томата к фитофторозу. *Сельскохозяйственная биология*. 2022;57(5):954-964). DOI: 10.15389/agrobiology.2022.5.954rus

Nascimento I.R.D., Maluf W.R., Figueira A.R., Menezes C.B., Resende J.T.V.D., Faria M.V., Nogueira D.W. Marker assisted identification of tospovirus resistant tomato genotypes in segregating progenies. *Scientia Agricola*. 2009;66:298-303. DOI: 10.1590/S0103-90162009000300003

Nowicki M., Foolad M.R., Nowakowska M., Kozik E.U. Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding. *Plant disease*. 2012;96(1):4-17. DOI: 10.1094/PDIS-05-11-0458

Panthee D.R., Gardner R.G., Ibrahem R., Anderson C. Molecular markers associated with *Ph-3* gene conferring late blight resistance in tomato. *American Journal of Plant Sciences*. 2015;6(13):2144-2150. DOI: 10.4236/ajps.2015.613216

Panthee D.R., Ibrahem R. New molecular markers associated with the *Sw-5* gene conferring resistance to *Tomato spotted wilt virus* in tomato. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 2013;88(2):129-134. DOI: 10.1080/14620316.2013.11512946

Park Y., Hwang J., Kim K., Kang J., Kim B., Xu S., Ahn Y. Development of the gene-based SCARs for the *Ph-3* locus, which confers late blight resistance in tomato. *Scientia Horticulturae*. 2013;164:9-16. DOI: 10.1016/j.scienta.2013.08.013

Petrov A.F., Koval Yu.I., Listkov V.Yu. The effect of various forms of nitrogen fertilizers on tomato yield. *Innovations and Food Safety*. 2019;(2):145-150. [in Russian] (Петров А.Ф., Коваль Ю.И., Листков В.Ю. Влияние различных форм азотных удобрений на урожайность томата. *Инновации и продовольственная безопасность*. 2019;(2):145-150). DOI: 10.31677/2311-0651-2019-24-2-145-151

Pidigam S., Thuraga V., Munnam S.B., Amarapalli G., Kuraba G., Pandravada S.R., Sudini H.K. Genetic diversity, population structure and validation of SSR markers linked to *Sw-5* and *I-2* genes in tomato germplasm. *Physiology and Molecular Biology of Plants*. 2021;27:1695-1710. DOI: 10.1007/s12298-021-01037-8

Reddy Y.S., Sellaperumal C., Prasanna H.C., Yadav A., Kashyap S.P., Singh S., Singh B. Screening of tomato genotypes against root-knot nematode and validation of *Mi 1* gene linked markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India, Section B: Biological Sciences*. 2018;88:65-72. DOI: 10.1007/s40011-016-0731-1

Ren Z., You Z., Munir S., Zhang Y., Li H., Zhang J., Ye Z. Development of a highly specific co-dominant marker for genotyping the *Ph-3* (tomato late blight resistance) locus by comparing cultivated and wild ancestor species. *Molecular Breeding*. 2019;39:45. DOI: 10.1007/s11032-019-0953-z

Seah S., Williamson V.M., Garcia B.E., Mejia L., Salus M.S., Martin C.T., Maxwell D.P. Evaluation of a co-dominant SCAR marker for detection of the Mi-1 locus for resistance to root-knot

nematode in tomato germplasm. *Tomato Genetic Cooperative Report*. 2007;57:37-40.
Shihab K.M. Abood I.D. Genetic segregation of tomato trihybrid, double cross and detection of *Mi1-2*, *Mi-3* resistance genes against root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.). *International Journal of Agricultural and Statistical Sciences*. 2019;15(1):153-162.
Shneyder Yu.A., Karimova E.V., Prikhodko Yu.N., Lozovaya E.N., Zhivaeva T.S. Tomato viruses, especially dangerous for vegetable growing of Russia. *Potatoes and vegetables*. 2021;(6):3-8. [in Russian] (Шнейдер Ю.А., Каримова Е.В., Приходько Ю.Н., Лозовая Е.Н., Живаева Т.С. Вирусы томата, особо опасные для овощеводства России. *Картофель и овощи.* 2021;(6):3-8). DOI: 10.25630/PAV.2021.93.45.001
Soler S., Cebolla-Cornejo J., Nuez F. Control of diseases induced by tospoviruses in tomato: an update of the genetic approach. *Phytopathologia Mediterranea*, 2003;42(3):207-219. DOI: 10.14601/Phytopathol_Mediterr-1716
Stevens M.R., Lamb E.M., Rhoads D.D. Mapping the *Sw-5* locus for tomato spotted wilt virus resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analyses. *Theoretical and Applied Genetics*. 1995;90:451-456. DOI: 10.1007/BF00221989
Tanksley S.D., Medina-Filho H., Rick C.M. Use of naturally-occurring enzyme variation to detect and map genes controlling quantitative traits in an interspecific backcross of tomato. *Heredity*. 1982;49(1):11-25. DOI: 10.1038/hdy.1982.61
Truong H.T.H., Tran H.N., Choi H.S., Park P.H., Lee H.E. Development of a co-dominant SCAR marker linked to the *Ph-3* gene for *Phytophthora infestans* resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*). *European Journal of Plant Pathology*. 2013;136(2):237-245. DOI: 10.1007/s10658-012-0157-4
Vabishchevich V.V. Tomato viruses: phytosanitary risk of introduction and spread (Virusy tomatov: fitosanitarnyy risk zanosa i rasprostraneniya). *Nashe Sel'skoye Khozyaystvo = Our Agriculture*. 2021;7:64-76. [in Russian] (Вабищевич В.В. Вирусы томатов: фитосанитарный риск заноса и распространения. *Наше сельское хозяйство*. 2021;7(255):64-76).
Wang Y.-Y., Chen C.-H., Hoffmann A., Hsu Y.-C., Lu S.-F., Wang J.-F., Hanson P. Evaluation of the *Ph-3* gene-specific marker developed for marker-assisted selection of late blight-resistant tomato. *Plant Breeding*. 2016;135(5):636-642. DOI: 10.1111/pbr.12395
Williamson V.M, Ho J.Y., Wu F.F., Miller N., Kaloshian I.A. PCR-based marker tightly linked to the nematode resistance gene, *Mi*, in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*. 1994;87:757-763. DOI: 10.1007/BF00221126
Zhang C., Liu L., Zheng Z., Sun Y., Zhou L., Yang Y., Cheng F., Zhang Z., Wang X., Huang S., Xie B., Du Y., Bai Y., Li J. Fine mapping of the *Ph-3* gene conferring resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*. 2013;126:2643-2653. DOI: 10.1007/s00122-013-2162-1

Информация об авторах

Иван Николаевич Шамшин, кандидат биологических наук, заведующий, лаборатория молекулярно-генетического анализа плодовых растений, Мичуринский государственный аграрный университет, 393760 Россия, Тамбовская область, Мичуринск, ул. Интернациональная, д. 101, ivan_shamshin@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-4464-1876
Алексей Сергеевич Ильичев, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярно-генетического анализа плодовых растений, Мичуринский государственный аграрный университет, 393760 Россия, Тамбовская область, Мичуринск, ул. Интернациональная, д. 101, ilichev.alekseyy@rambler.ru, https://orcid.org/0000-0001-9203-9217
Мария Григорьевна Фомичева, кандидат биологических наук, научный сотрудник, лаборатории репродуктивной биотехнологии в селекции сельскохозяйственных культур, Федеральный научный центр овощеводства, 143080 Россия, Московская область, Одинцовский городской округ, поселок ВНИИССОК, ул. Селекционная, д. 14, maria.fomicheva.1@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0002-0281-0467
Екатерина Владимировна Грошева, научный сотрудник, лаборатория молекулярно-генетического анализа плодовых растений, Мичуринский государственный аграрный университет, 393760 Россия, Тамбовская область, Мичуринск, ул. Интернациональная, д. 101, ekaterina2687@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-6992-2407

Information about the authors

Ivan N. Shamshin, Cand. Sci. (Biology), Head, Laboratory of Molecular Genetic Analysis of Fruit Plants, Michurinsk State Agrarian University, 101, Internatsional'naya Street, Michurinsk, Tambov Region, 393760 Russia, ivan_shamshin@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-4464-1876
Alexey S. Ilyichev, Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Genetic Analysis of Fruit Plants, Michurinsk State Agrarian University, 101, Internatsional'naya Street, Michurinsk, Tambov Region, 393760 Russia, ilichev.alekseyy@rambler.ru, https://orcid.org/0000-0001-9203-9217
Maria G. Fomicheva, Cand. Sci. (Biology), Research Associate, Laboratory of Reproductive Biotechnology in Agricultural Crop Breeding, Federal Scientific Vegetable Center, 14, Selektsionnaya Street, VNIISSOK settlement, Odintsovo urban district, Moscow Region, 143080 Russia, maria.fomicheva.1@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0002-0281-0467
Ekaterina V. Grosheva, Research Associate, Laboratory of Molecular Genetic Analysis of Fruit Plants, Michurinsk State Agrarian University, 101, Internatsional'naya Street, Michurinsk, Tambov Region, 393760 Russia, ekaterina2687@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-6992-2407

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 12.03.2024; одобрена после рецензирования 28.07.2024; принята к публикации 08.08.2024.
The article was submitted on 12.03.2024; approved after reviewing on 28.07.2024; accepted for publication on 08.08.2024.

Научная статья
УДК 634.711:631.526.32:069.5:582:633.52:575
DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o5

(cc) BY

Номенклатурные стандарты и микросателлитные профили сортов малины селекции Федерального научного центра им. И. В. Мичурина

А. М. Камнев[1], Т. В. Жидехина[2], О. Ю. Антонова[1], С. Е. Дунаева[1], И. Г. Чухина[1], Т. А. Гавриленко[1]

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

[2]Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина, Мичуринск, Россия

Автор, ответственный за переписку: Татьяна Андреевна Гавриленко, tatjana9972@yandex.ru

В соответствии с правилами Международного кодекса номенклатуры культурных растений оформлены номенклатурные стандарты трех сортов малины обыкновенной (*Rubus idaeus* L.), созданных в Федеральном научном центре имени И.В. Мичурина (ФНЦ им. И.В. Мичурина). Номенклатурные стандарты сортов ‘Клеопатра’ (WIR-98480), ‘Суламифь’ (WIR-98517) и ‘Шахразада’ (WIR-98536) переданы в Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР) на хранение в Гербарии культурных растений мира, их диких родичей и сорных растений (WIR). Согласно комплексной стратегии регистрации и сохранения отечественных сортов вегетативно размножаемых культур в генбанке ВИР, растительный материал, собранный с тех же самых растений автором сортов в ФНЦ им. И.В. Мичурина, был передан не только для создания номенклатурных стандартов, но и для их генотипирования, а также для сохранения в живом виде в коллекции ВИР. С использованием ядерных SSR-маркеров детектирован аллельный состав шести микросателлитных локусов у сортов ‘Клеопатра’, ‘Суламифь’, ‘Шахразада’, для каждого сорта получен индивидуальный микросателлитный профиль. Генотипированные образцы тех же сортов малины, генотипически идентичные номенклатурным стандартам, переданы в полевую коллекцию ВИР, а также сохраняются в контролируемых условиях в коллекции *in vitro* ВИР.

***Ключевые слова*:** *Rubus idaeus* L., сорта, гербарная коллекция, генотипирование, *in vitro* коллекция

Благодарности: Статья подготовлена согласно тематическому плану ВИР по темам: № FGEM-2022-0004, № FGEM-2022-0006 и № FGEM-2022-0008. Авторы благодарят сотрудника ФНЦ им. И.В. Мичурина Гурьеву И.В. за помощь в сборе растительного материала трех сортов из коллекции сортообразцов этого центра и передачи его в ВИР.

Для цитирования: Камнев А.М., Жидехина Т.В., Антонова О.Ю., Дунаева С.Е., Чухина И.Г., Гавриленко Т.А. Номенклатурные стандарты и микросателлитные профили сортов малины селекции Федерального научного центра им. И.В. Мичурина. *Биотехнология и селекция растений*. 2024;7(3):31-41. DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o5

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.

© Камнев А.М., Жидехина Т.В., Антонова О.Ю., Дунаева С.Е., Чухина И.Г., Гавриленко Т.А., 2024

Original article
DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o5

Nomenclatural standards and microsatellite profiles of raspberry cultivars bred at the I.V. Michurin Federal Scientific Center

Anton M. Kamnev[1], Tatiana V. Zhidekhina[2], Olga Yu. Antonova[1], Svetlana E. Dunaeva[1], Irena G. Chukhina[1], Tatiana A. Gavrilenko[1]

[1]N.I. Vavilov All-Russian Research Institute of Plant Genetic Resources, Saint-Petersburg, Russia

[2]I.V. Michurin Federal Scientific Center, Michurinsk, Russia

Corresponding author: Tatjana A. Gavrilenko, tatjana9972@yandex.ru

Nomenclatural standards of three raspberry (*Rubus idaeus* L.) cultivars 'Kleopatra' (WIR-98480), 'Sulamif'' (WIR-98517) and 'Shakhrazada' (WIR-98536) bred at the I.V. Michurin Federal Scientific Center (FSC) were prepared according to the International Code of Nomenclature for Cultivated Plants. The nomenclatural standards of these cultivars have been transferred to N.I. Vavilov Federal Research Center of the All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR) for storage in the Herbarium of Cultivated Plants of the World, Their Wild Relatives and Weeds (WIR). Plant material for herbarium specimens was collected in the experimental field of the I.V. Michurin FSC by the cultivars' author and handed to VIR for genotyping as well as for preservation in the live collection of VIR in compliance with the comprehensive strategy for registering and preserving domestic cultivars of the vegetatively propagated crops in a genebank. Microsatellite profiles of the three cultivars in question were obtained by using six nuclear SSR-markers. The genotyped specimens of the same raspberry cultivars, genotypically identical to the nomenclatural standards, were transferred to the VIR field collection and preservation in controlled conditions in the VIR *in vitro* collection.

Keywords: *Rubus idaeus* L., cultivars, herbarium collection, genotyping, *in vitro* collection

Acknowledgements: The article was prepared in accordance with the Thematic Plan of VIR, topics Nos. FGEM-2022-0004, FGEM-2022-0006 and FGEM-2022-0008. The authors thank I.V. Guryeva, an employee of the I.V. Michurin Federal Scientific Center, for her assistance in collecting plant material of three varieties from the collection of variety populations at this Center and transferring it to VIR.

For citation: Kamnev A.M., Zhidekhina T.V., Antonova O.Yu., Dunaeva S.E., Chukhina I.G., Gavrilenko T.A. Nomenclatural standards and microsatellite profiles of raspberry cultivars bred at the I.V. Michurin Federal Scientific Center. *Plant Biotechnology and Breeding.* 2024;7(3):31-41. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o5

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.

© Kamnev A.M., Zhidekhina T.V., Antonova O.Yu., Dunaeva S.E., Chukhina I.G., Gavrilenko T.A., 2024

Введение

В ВИР была инициирована новая комплексная стратегия, направленная на развитие подходов и методов регистрации и сохранения в генбанке отечественных сортов вегетативно размножаемых культур (Gavrilenko, Chukhina, 2020). Это направление реализуется в совместных исследованиях сотрудников ВИР и селекционеров – авторов сортов. Предложенная комплексная стратегия включает документирование сорта с помощью номенклатурного стандарта, который оформляют в соответствии с Международным кодексом номенклатуры культурных растений (Brickell et al., 2016), а также документирование сорта с помощью молекулярно-генетических методов и сохранение в живом виде охарактеризованного образца (генотипически идентичного номенклатурному стандарту) в полевой, крио- и *in vitro* коллекциях ВИР.

В настоящей работе представлены результаты реализации этой комплексной стратегии для сортов малины обыкновенной (*Rubus idaeus* L.) селекции Федерального научного центра им. И.В. Мичурина – ФНЦ им. И.В. Мичурина – старейшего научного учреждения нашей страны, в котором исследования по селекции и генетике садовых культур проводят более 90 лет. Начало работ по селекции малины в России связано с именем И.В. Мичурина, который в конце XIX – начале XX века вывел сорта малины: ‘Арабка’, ‘Белая ананасная’, ‘Дамская’, ‘Дочь Коммерции’, ‘Коммерция’, ‘Прогресс’, ‘Продуктивная’ и ‘Фея’ (Zhidekhina, 2005). И.В. Мичурин разрабатывал новые для того времени методы, включающие скрещивания географически отдаленных форм и межвидовую гибридизацию (Kazakov, 1989); в дальнейшем эти работы были продолжены несколькими поколениями селекционеров.

Планомерная селекционная работа в ФНЦ им. И.В. Мичурина (ранее ВНИИС им. И.В. Мичурина) проводилась селекционерами: М.И. Кашичкиной, К.Т. Ярковой, Н.В. Сергеевой, Л.Л. Труниным с 1944 по 1991 год (Kashichkina, 1955; Zhidekhina, 2011a). Основные задачи в селекции малины включали: получение высоко адаптивных и продуктивных сортов, пригодных для механизированного ухода и уборки урожая; выведение сортов, характеризующихся дружным созреванием плодов с высокими вкусовыми и товарными качествами. В разные годы из гибридного фонда, созданного в институте, были выделены сорта малины: ‘Новость Мичуринска’, ‘Тамбовская’, ‘Мичуринская десертная’, ‘Родная’ и ‘Яркая’ (Zhidekhina, 2011b).

С 1992 года изучением сортов малины в ФНЦ им. И.В. Мичурина занимается к. с.-х. наук Т.В. Жидехина. Комплексная многолетняя оценка гибридного фонда, включающего более 3000 гибридных сеянцев, полученных ранее Л.Л. Труниным, позволила Т.В. Жидехиной выделить и передать на государственное испытание в 2006 году три сорта малины: ‘Клеопатра’, ‘Суламифь’ и ‘Шахразада’.

Цель настоящего исследования состояла в создании номенклатурных стандартов трёх сортов, их генотипировании и сохранении в генбанке ВИР.

Материалы и методы

Растительный материал трех сортов малины: ‘Клеопатра’, ‘Суламифь’ и ‘Шахразада’, созданных в Федеральном научном центре им. И.В. Мичурина – ФНЦ им. И.В. Мичурина, был отобран автором этих сортов Т.В. Жидехиной в 2021-2022 годах в соответствии с протоколами, разработанными в ВИР (Gavrilenko et al., 2022). Для гербаризации и последующего оформления номенклатурных стандартов в Гербарий культурных растений мира, их диких родичей и сорных растений ВИР (WIR), далее – Гербарий ВИР, были переданы средние части побегов первого и второго года, а также латеральные ветви с плодами; для выделения ДНК дополнительно передали верхние части побегов первого года; корневые отпрыски передавали для посадки на опытном поле ВИР и последующего введения этих сортов в полевую и *in vitro* коллекции ВИР. В ФНЦ им. И.В. Мичурина весь растительный материал был собран с одного и того же растения каждого из трех сортов.

Из ФНЦ им. И.В. Мичурина вместе с растительным материалом в ВИР передали фотографии цветков и плодов сортов, а также копии авторских свидетельств о регистрации селекционного достижения и патентов. Гербаризацию проводили в соответствии с методическими указаниями «Гербаризация культурных растений» (Belozor, 1989). Оформление и подготовку к обнародованию номенклатурных стандартов проводили в соответствии с положениями Международного кодекса номенклатуры культурных растений (Brickell et al., 2016; International Code…, 2022).

Выделение ДНК. Препараты геномной ДНК получали путем использования модифицированного метода CTAB-экстракции (Antonova et al., 2020). Экстракцию ДНК проводили из молодых листьев побега первого года, средняя часть которого была использована для гербаризации. Дополнительно выделяли ДНК из молодых листьев побега первого года, взятых от растений полевой коллекции ВИР, сформировавшихся из корневых отпрысков, переданных в ВИР из ФНЦ им. И.В. Мичурина. Таким образом, для каждого сорта было получено два независимо выделенных препарата ДНК.

Микросателлитный анализ провели при помощи шести микросателлитных (SSR-) маркеров, четыре из которых были отобраны из литературных источников: ERubL_SQ01_G16, ERubL_SQ19_1_A05 (Woodhead et al., 2008), RiM017 (Castillo et al., 2010), ssrRhCBA30 (Lopes et al., 2006). Еще две пары праймеров FJ194446_new (F: AAAGACAAGGCGTCCACAAC, R: CAGCAGCGTCTGATACCAAA) и FJ194452_new (F: CACCGATCAGAGCTAATTCTGG, R: ACTACTGCTTCTGTTGCACA) были разработаны

в данном исследовании на основе содержащих микросателлитные локусы последовательностей (FJ194446 и FJ194452, соответственно), приведенных в базе NCBI (URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ [дата обращения 01.08.2024]). Для разработки праймеров использовали программу Primer3plus (Untergasser et al., 2007).

ПЦР проводили в реакционной смеси объемом 14 мкл, содержащей 40 нг геномной ДНК, 1 × реакционный буфер (Диалат, Москва), 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,5 мМ каждого из dNTPs, 0,20 мкМ прямого и обратного праймеров, 100 нМ прямого праймера M13, меченного флуоресцентным красителем, и 1 ед. Taq-полимеразы (Диалат, Москва). Для всех праймеров использовали единообразную программу с функцией Touchdown: 94°C – 3 минуты 30 секунд; 8 циклов [94°C – 45 секунд, T°m+4°C – 1 минута 30 секунд с понижением на 0,5°C на 1 цикл, 72°C – 1 минута]; 32 цикла [94°C – 45 секунд, T°m – 45 секунд, 72°C – 1 минута], и заключительный этап элонгации при 72°C – 5 минут. Температуры отжига соответствовали рекомендованным авторами праймеров, отжиг новых праймеров FJ194446_new и FJ194452_new проводили при T°m=50°C.

Разделение SSR-фрагментов проводили в 8% ПААГ в денатурирующих условиях на аппарате Li-Cor 4300S (LI-COR Biosciences, США) с лазерной детекцией фрагментов. Дополнительно размеры фрагментов уточняли с помощью капиллярного электрофореза на аппарате Нанофор 05 (Синтол, Россия).

Введение в коллекцию *in vitro* ВИР. Все этапы работ по введению образцов в культуру *in vitro*, укоренению, микроразмножению и среднесрочному сохранению микрорастений были проведены в соответствии с разработанными в ВИР методиками (Dunaeva et al., 2017).

Результаты и обсуждение

Номенклатурные стандарты сортов малины селекции Федерального научного центра им. И.В. Мичурина – ФНЦ им. И.В. Мичурина – оформлены в соответствии с рекомендациями Международного кодекса номенклатуры культурных растений (ICNCP), зарегистрированы в базе данных «Гербарий ВИР» и переданы на хранение в Гербарий культурных растений мира, их диких родичей и сорных растений (WIR).

Цитаты этикеток номенклатурных стандартов приводятся ниже, а их изображения приведены на рисунках 1-3.

Rubus idaeus L. сорт '**Клеопатра**', авторы: Т.В. Жидехина, Л.Л. Трунин. **'Kleopatra'**, authors: T.V. Zhidekhina, L.L. Trunin.

Nomenclatural standard: Происхождение: ФГБНУ «Федеральный научный центр им. И.В. Мичурина» (ранее ФГБНУ «Всероссийский НИИ садоводства им. И.В. Мичурина»). Репродукция: «ФНЦ им. И.В. Мичурина». 12 VIII 2021 (однолетний побег), 12 VII 2022 (двулетний побег, латералы). Собр. Жидехина Т.В., Гурьева И.В., Камнев А.М., опр. Жидехина Т.В. – Origin: I.V. Michurin Federal Scientific Center (earlier I.V. Michurin All-Russian Scientific Research Institute of Horticulture), Michurinsk, Russia. 12 VIII 2021 (primocane), 12 VII 2022 (floricane). Coll. Zhidekhina T.V., Gur'eva I.V., Kamnev A.M., det.: Zhidekhina T.V. **WIR-98480**.

Примечание: гербарный образец представлен на трех листах.

Rubus idaeus L. сорт '**Суламифь**', авторы: Т.В. Жидехина, Л.Л. Трунин. **'Sulamif"**, authors: T.V. Zhidekhina, L.L. Trunin.

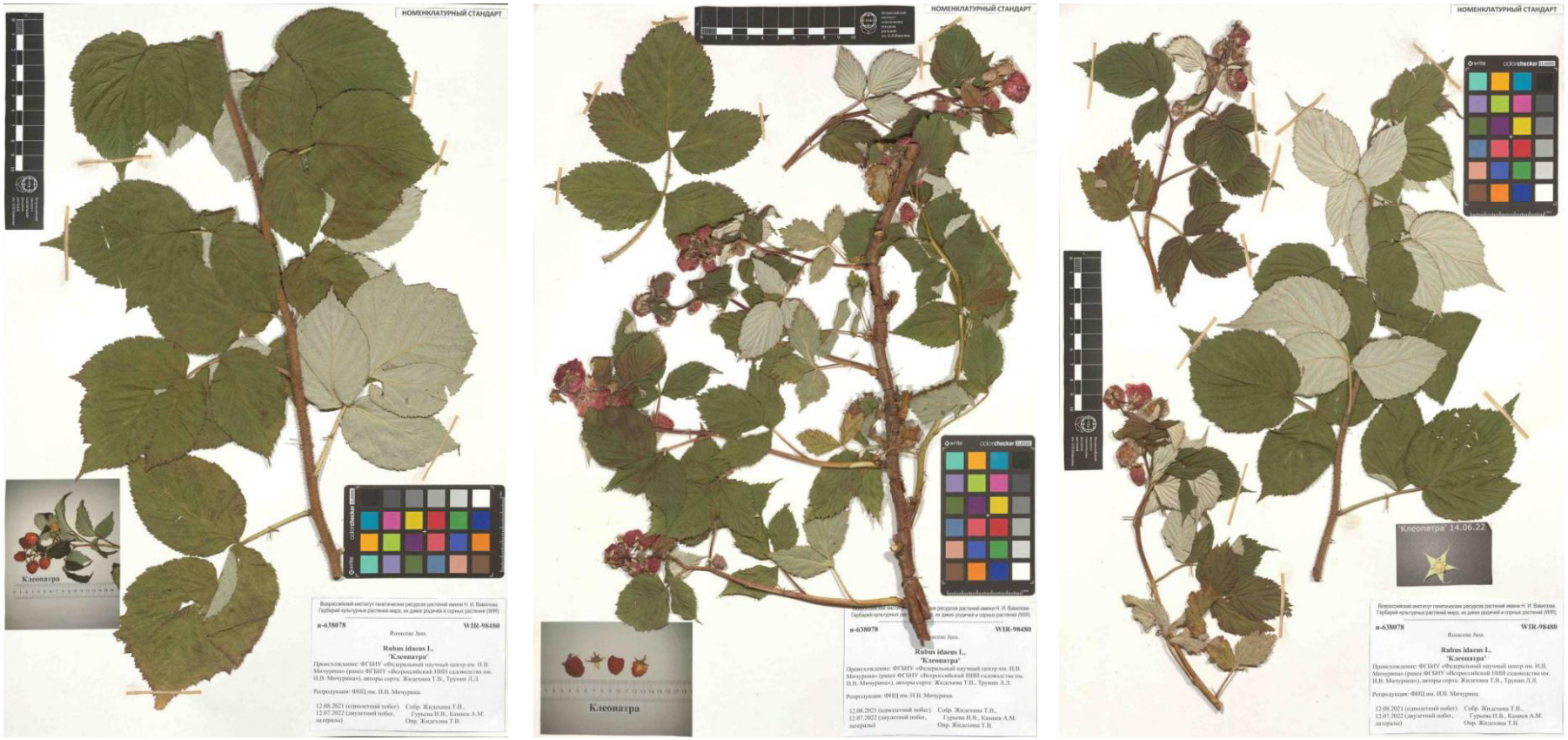
Nomenclatural standard: Происхождение: ФГБНУ «Федеральный научный центр им. И.В. Мичурина» (ранее ФГБНУ «Всероссийский НИИ садоводства им. И.В. Мичурина»). Репродукция: «ФНЦ им. И.В. Мичурина». 12 VIII 2021 (однолетний побег), 12 VII 2022 (двулетний побег, латералы). Собр. Жидехина Т.В., Гурьева И.В., Камнев А.М., опр. Жидехина Т.В. – Origin: I.V. Michurin Federal Scientific Center (earlier I.V. Michurin All-Russian Scientific Research Institute of Horticulture), Michurinsk, Russia. 12 VIII 2021 (primocane), 12 VII 2022 (floricane). Coll. Zhidekhina T.V., Gur'eva I.V., Kamnev A.M., det.: Zhidekhina T.V. **WIR-98517**.

Примечание: гербарный образец представлен на четырех листах.

Rubus idaeus L. сорт '**Шахразада**', авторы: Т.В. Жидехина, Л.Л. Трунин. **'Shakhrazada'**, authors: T.V. Zhidekhina, L.L. Trunin.

Nomenclatural standard: Происхождение: ФГБНУ «Федеральный научный центр им. И.В. Мичурина» (ранее ФГБНУ «Всероссийский НИИ садоводства им. И.В. Мичурина»). Репродукция: «ФНЦ им. И.В. Мичурина». 12 VIII 2021 (однолетний побег), 12 VII 2022 (двулетний побег, латералы). Собр. Жидехина Т.В., Гурьева И.В., Камнев А.М., опр. Жидехина Т.В. – Origin: I.V. Michurin Federal Scientific Center (earlier I.V. Michurin All-Russian Scientific Research Institute of Horticulture), Michurinsk, Russia. 12 VIII 2021 (primocane), 12 VII 2022 (floricane). Coll. Zhidekhina T.V., Gur'eva I.V., Kamnev A.M., det.: Zhidekhina T.V. **WIR-98536**.

Примечание: гербарный образец представлен на четырех листах.



a **b** **c**

Рис. 1. Номенклатурный стандарт сорта ‘Клеопатра’ (WIR-98480), представленный на трех листах:
a – средняя часть побега первого года, b – средняя часть побега второго года,
c – латеральные ветви с плодами и верхняя часть побега первого года

Fig. 1. Nomenclatural standard of *Rubus idaeus* ‘Kleopatra’ (WIR-98480) represented by three sheets:
a – primocane middle part, b – floricane middle part, c – laterals with fruits and primocane upper part

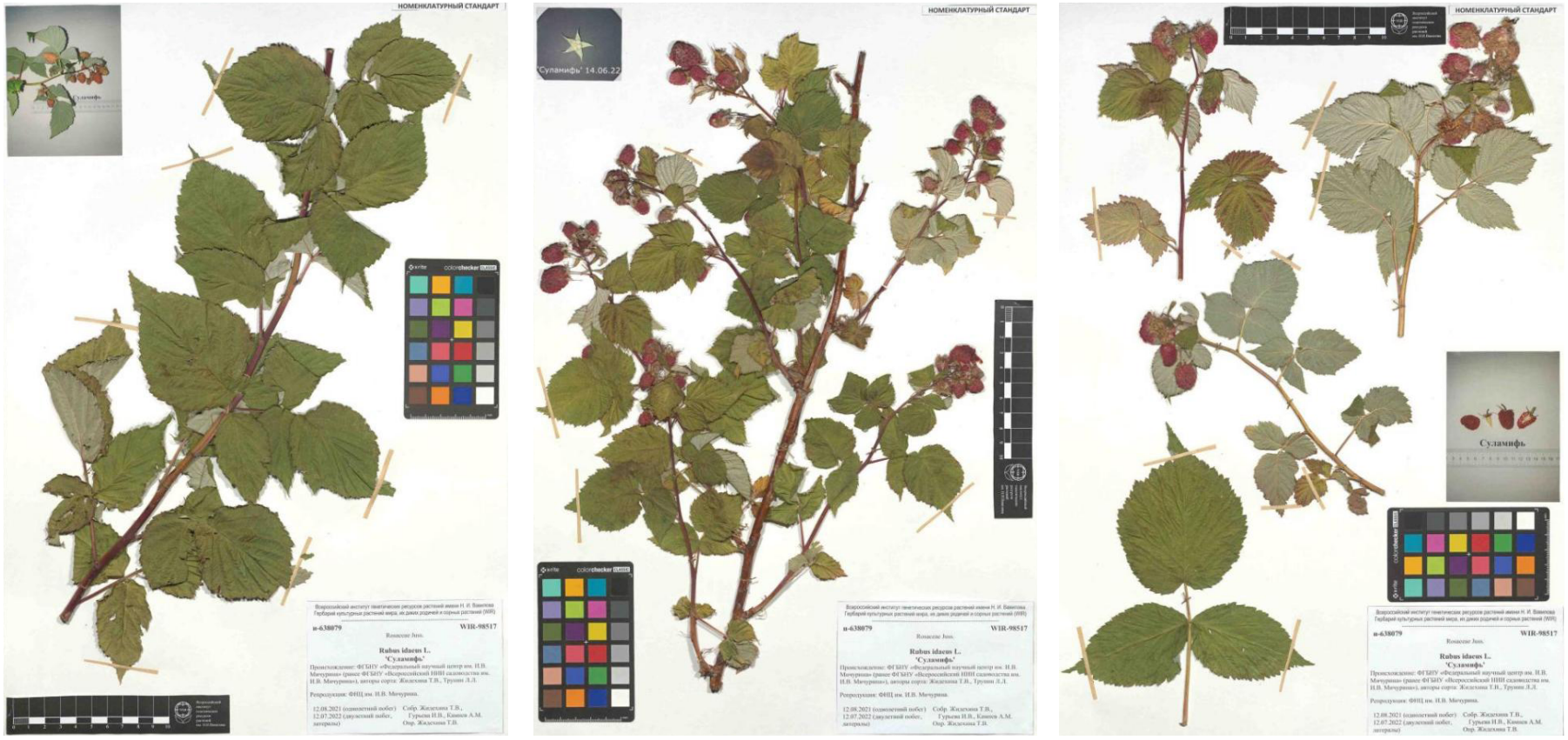


Рис. 2. Номенклатурный стандарт сорта ‘Суламифь’ (WIR-98517), три гербарных листа:
a – средняя часть побега первого года, b – средняя часть побега второго года, c – латеральные ветви с плодами

Fig. 2. Nomenclatural standard of *Rubus idaeus* ‘Sulamif’ (WIR-98517), represented by three sheets:
a – primocane middle part, b – floricane middle part, c – laterals with fruits

a **b** **c**

Рис. 3. Номенклатурный стандарт сорта ‘Шахразада’ (WIR-98536), три гербарных листа:
a – средняя часть побега первого года, b – средняя часть побега второго года,
c – латеральные ветви с плодами и верхняя часть побега первого года

Fig. 3. Nomenclatural standard of *Rubus idaeus* ‘Shakhrazada’(WIR-98536) represented by three sheets:
a – primocane middle part, b – floricane middle part, c – laterals with fruits and primocane upper part

Молекулярно-генетический анализ сортов малины. В таблице представлены результаты генотипирования сортов малины ‘Клеопатра’, ‘Суламифь’ и ‘Шахразада’ селекции ФНЦ им. И.В. Мичурина, проведенного с использованием набора из шести SSR-маркеров. У сортов ‘Клеопатра’, ‘Суламифь’ и ‘Шахразада’ выявлено 12 аллелей в шести изученных микросателлитных локусах; для каждого сорта получен индивидуальный микросателлитный профиль (таблица).

Отметим, что в SSR-анализе каждый сорт был представлен двумя независимо выделенными препаратами ДНК: (а) ДНК, изолированная из листьев побегов перед их гербаризацией и (б) ДНК, изолированная из корневых отпрысков, отделенных от тех же самых растений в ФНЦ им. И.В. Мичурина; эти корневые отпрыски впоследствии передавались в полевую коллекцию ВИР. При сопоставлении SSR-профилей, полученных для двух препаратов ДНК каждого сорта, различий в аллельном составе шести изученных SSR-локусов выявлено не было.

В настоящем исследовании были использованы как известные из литературы, так и разработанные нами SSR-праймеры, с применением которых был выявлен полиморфизм в трёх из шести изученных SSR-локусов. Отметим, что изученные сорта малины, созданные в ФНЦ им. И.В. Мичурина, имеют общий генотипический бэкграунд. Так, в создании каждого из них в качестве отцовской родительской формы был использован один и тот же межсортовой гибрид – отборная форма 188-14 (‘Обильная’ × ‘Барнаульская’), а у сортов ‘Суламифь’ и ‘Шахразада’ была и общая материнская форма – сорт ‘Столичная’ (см. таблица).

Ядерные SSR-маркеры используются для генотипирования зарубежных (Castillo et al., 2010; Girichev et al., 2015) и отечественных (Gashenko et al., 2023) сортов малины обыкновенной. В настоящей работе представлены наши первые результаты SSR-генотипирования сортов малины, исследования полиморфизма микросателлитных локусов отечественных сортов будут продолжены с расширенным набором маркеров и привлечением сортов различного происхождения.

Таблица. Молекулярно-генетические профили сортов малины, созданных в ФНЦ им. И.В. Мичурина

Table. Molecular-genetic profiles of cultivars bred at the I.V. Michurin FSC

Характеристики/Characteristics	Молекулярно-генетический профиль сорта/ Molecular-genetic profile of the cultivar		
	‘Клеопатра’/ ‘Kleopatra’	**‘Суламифь’/ ‘Sulamif”**	**‘Шахразада’/ ‘Shakhrazada’**
Год внесения в Госреестр	2017	2017	2015
Код Госреестра	9359086	9359084	9359085
№ патента	72366	9597	8008
Авторы:	Т.В. Жидехина, Л.Л. Трунин	Т.В. Жидехина, Л.Л. Трунин	Т.В. Жидехина, Л.Л. Трунин
Метод выведения – сорт получен путем	скрещивания сорта ‘Маросейка’ и отборной формы 188-14 (‘Обильная’ × ‘Барнаульская’) (Sedov, 2014)	скрещивания сорта ‘Столичная’ и отборной формы 188-14 (‘Обильная’ × ‘Барнаульская’) (Sedov, 2014)	скрещивания сорта ‘Столичная’ и отборной формы 188-14 (‘Обильная’ × ‘Барнаульская’) (Sedov, 2014)
SSR-маркеры:	Размер фрагмента (пн):	Размер фрагмента (пн):	Размер фрагмента (пн):
ERubL_SQ05_4_E09	159	159	159
ERubL_SQ01_G16	199; 201	199; 201	199; 201
FJ194446_new	117; 121	119; 121	115; 117
FJ194452_new	130	130; 133	130
RiM017	184; 194	194	194
ssrRhCBA30	197	197	197

Сохранение сортов малины селекции ФНЦ им. И.В. Мичурина в коллекции *in vitro* в ВИР. Из ФНЦ им. И.В. Мичурина вместе с побегами первого и второго годов, предназначенными для гербаризации, в ВИР передавались и корневые отпрыски, отделенные от тех же растений каждого сорта. Корневые отпрыски трех сортов малины ‘Клеопатра’, ‘Суламифь’ и ‘Шахразада’ были высажены на экспериментальном поле научно-производственной базы «Пушкинские и Павловские лаборатории ВИР» для последующего введения образцов в культуру *in vitro.* В летний период 2023 и 2024 годов из побегов появившейся поросли вычленяли почки, которые послужили эксплантами для введения в культуру *in vitro*. В настоящее время в коллекции *in vitro* ВИР сохраняются образцы сортов малины ‘Клеопатра’ (и- 638078), ‘Суламифь’ (и-638079) и ‘Шахразада’ (и- 638080). Начаты эксперименты по криоконсервации апексов *in vitro* растений для долгосрочного депонирования образцов в криобанке ВИР.

После введения в коллекцию *in vitro,* полученные из ФНЦ им. И.В. Мичурина образцы сортов малины ‘Клеопатра’, ‘Суламифь’ и ‘Шахразада’ были переданы в поле-

вую коллекцию ВИР.

В результате выполненного исследования расширилась коллекция номенклатурных стандартов отечественных сортов малины, сохраняемых в Гербарии ВИР, которая включает сорта, созданные в НИИСС им. М.А. Лисавенко (ФГБНУ ФАНЦА), СибНИИРС – филиал ИЦиГ СО РАН и Свердловской ССС ФГБНУ «УрФАНИЦ УрО РАН» (Kamnev et al., 2021; 2022). Важным результатом является пополнение *in vitro* коллекций ВИР образцами сортов малины селекции ФНЦ им. И.В. Мичурина. В полевую коллекцию ВИР переданы генотипированные образцы генотипически идентичные номенклатурным стандартам сортов ‘Клеопатра’, ‘Суламифь’ и ‘Шахразада’.

Заключение

Номенклатурные стандарты трех сортов малины селекции Федерального научного центра им. И.В. Мичурина – ФНЦ им. И.В. Мичурина – ‘Клеопатра’ (WIR-98480), ‘Суламифь’ (WIR-98517) и ‘Шахразада’ (WIR-98536) – были зарегистрированы и переданы на хранение в Гербарий ВИР. Проведено SSR-генотипирование этих сортов, получены их микросателлитные профили. В полевую коллекцию ВИР переданы образцы этих трёх сортов, генотипически идентичные номенклатурным стандартам. Образцы перечисленных трёх сортов введены в *in vitro* коллекцию ВИР.

References/Литература

Antonova O.Yu., Klimenko N.S., Rybakov D.A., Fomina N.A., Zheltova V.V., Novikova L.Yu., Gavrilenko T.A. SSR analysis of modern Russian potato varieties using DNA samples of nomenclatural standards. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(4):77-96. [In Russian] (Антонова О.Ю., Клименко Н.С., Рыбаков Д.А., Фомина Н.А., Желтова В.В., Новикова Л.Ю., Гавриленко Т.А. SSR-анализ современных российских сортов картофеля с использованием ДНК номенклатурных стандартов. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(4):77-96). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-4-o2

Belozor N.I. (comp.) Herbarization of cultivated plants: (guidelines) (Gerbarizatsiya kulturnykh rastenii: (metodicheskie ukazaniya)). Leningrad: VIR; 1989. [in Russian] (Гербаризация культурных растений: (методические указания) / сост. Н.И. Белозор. Ленинград: ВИР; 1989).

Brickell C.D., Alexander C., Cubey J.J., David J.C., Hoffman M.H.A., Leslie A.C., Malecot V., Jin X. (eds). International Code of Nomenclature for Cultivated Castillo Plants. Leuven: ISHS Secretariat; 2016.

Castillo N.R.F., Reed B.M., Graham J., Fernández-Fernández F., Bassil N.V. Microsatellite markers for raspberry and blackberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 2010;135(3):271-278. DOI: 10.21273/JASHS.135.3.271

Dunaeva S.E., Pendinen G.I., Antonova O.Yu., Shvachko N.A., Ukhatova Y.V., Shuvalova L.E. Volkova N.N., Gavrilenko T.A. Preservation of vegetatively propagated crops in *in vitro* and cryocollections: methodological guidelines. (Sokhraneniye vegetativno razmnozhayemykh kul’tur v *in vitro* i kriokollektsiyakh: metodicheskiye ukazaniya). T.A. Gavrilenko (ed.). 2nd ed. St. Petersburg: VIR; 2017. [in Russian] (Дунаева С.Е., Пендинен Г.И., Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Ухатова Ю.В., Шувалова Л.Е., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и криоколлекциях: методические указания / под ред. Т.А. Гавриленко. 2-е изд. Санкт-Петербург: ВИР; 2017).

Gashenko T.A., Frolova L.V., Bozhidai T.N. Study of the genetic diversity of raspberry samples using SSR-markers. *Fruit-growing*. 2023;35:54-61. [In Russian] (Гашенко Т.А., Фролова Л.В., Божидай Т.Н. Изучение генетического разнообразия образцов малины с использованием SSR-маркеров. *Плодоводство*. 2023;35:54-61). DOI: 10.47612/0134-9759-2023-35-54-53

Gavrilenko T.A., Chukhina I.G. Nomenclatural standards of modern Russian potato cultivars preserved at the VIR herbarium (WIR): A new approach to cultivar genepool registration in a genebank. *Plant Biotechnology and Breeding*. 2020;3(3):6-17. [in Russian] (Гавриленко Т.А., Чухина И.Г. Номенклатурные стандарты современных российских сортов картофеля, хранящиеся в гербарии ВИР (WIR): новые подходы к регистрации сортового генофонда в генбанках. *Биотехнология и селекция растений*. 2020;3(3):6-17). DOI: 10.30901/2658-6266-2020-3-o2

Gavrilenko T.A., Dunaeva S.E., Tikhonova O.A., Chukhina I.G. New approaches to registration and conservation of domestic cultivars of berry crops in the VIR Genebank on the example of red raspberry and black currant. *Plant Biotechnology and Breeding.* 2022;5(4):24-38. [In Russian] (Гавриленко Т.А., Дунаева С.Е., Тихонова О.А., Чухина И.Г. Новые подходы к регистрации и сохранению отечественных сортов ягодных культур в генбанке ВИР на примере малины обыкновенной и смородины черной. *Биотехнология и селекция растений*. 2022;5(4):24-38). DOI: 10.30901/2658-6266-2022-4-o5

Girichev V., Hanke M.-V., Peil A., Flachowsky H. SSR fingerprinting of a German *Rubus* collection and pedigree based evaluation on trueness-to-type. *Genetic Resources and Crop Evolution.* 2015;64:189-203. DOI: 10.1007/s10722-015-0345-0

International Code of Nomenclature for Cultivated Plants. Division III–VI, Appendix I–IX. I.G. Chukhina, S.R. Miftakhova, V.I. Dorofeyev (transl.).Transl. of: «International Code of Nomenclature for Cultivated Plants. Ed. 9. Scripta Horticulturae. 2016;18:I-XVII+1-190». *Vavilovia*. 2022;5(1):41-70. [in Russian] (Международный кодекс номенклатуры культурных растений. Часть III–VI, Приложение I–IX / перевод с английского И.Г. Чухина, С.Р. Мифтахова, В.И. Дорофеев. Пер. изд.: «International Code of Nomenclature for Cultivated Plants. Ed. 9. Scripta Horticulturae. 2016;18:I-XVII+1-190». *Vavilovia*. 2022;5(1):41-70).

Kamnev A.M., Dunaeva S.E., Nevostrueva E.Yu., Kuzmina A.A., Gavrilenko T.A., Chukhina I.G. Nomenclatural standards of raspberry cultivars bred by the Sverdlovsk Horticultural Breeding Station and Novosibirsk Zonal Gardening Station. *Vavilovia*. 2022;5(4):13-38. [In Russian] (Камнев А.М., Дунаева С.Е., Невоструева Е.Ю., Кузьмина А.А., Гавриленко Т.А., Чухина И.Г. Номенклатурные стандарты сортов малины селекции Свердловской селекционной станции садоводства и Новосибирской зональной станции садоводства. *Vavilovia*. 2022;5(4):13-38). DOI: 10.30901/2658-3860-2022-4-o3

Kamnev A.M., Yagovtseva N.D., Dunaeva S.E., Gavrilenko T.A., Chukhina I.G. Nomenclatural standards of raspberry cultivars bred in the Altai. *Vavilovia*. 2021;4(2):26-43. [In Russian] (Камнев А.М., Яговцева Н.Д., Дунаева С.Е., Гавриленко Т.А., Чухина И.Г. Номенклатурные стандарты сортов малины Алтайской селекции. *Vavilovia*. 2021;4(2):26-43). DOI: 10.30901/2658-3860-2021-2-26-43

Kashichkina M.I. Raspberry breeding (Selektsiya maliny). In: *The teachings of Michurin - at the service of the people = Michurinskoe uchenie na sluzhbe narodu*. Iss. 2. Moscow: Selkhozgiz; 1955. p.235-237. [In Russian] (Кашичкина М.И. Селекция малины. В кн.: *Мичуринское учение на службе народу*. Москва: Сельхозгиз; 1955. Вып. 2. С.235-237).

Kazakov I.V. Raspberry breeding in Central Russia (Selektsiya maliny v sredney polose Rossii). Tula; 1989. [In Russian] (Казаков И.В. Селекция малины в средней полосе России. Тула; 1989).

Lopes M., Maciel G., Mendonca D., Gil F., Da Camara A. Isolation and characterization of simple sequence repeat loci in *R. hochstetterorum* and their use in other species from the *Rosaceae* family. *Molecular Ecology Notes.* 2006;6:750-752. DOI: 1111/j.1471-8286.2006.01329.x

Sedov E.N. (ed.) Pomology. Vol. 5. Strawberry, raspberry, nut and rare crops. Orel: VNIISPB; 2014. [In Russian] (Помология. Т. 5. Земляника, малина, орехоплодные и редкие культуры / ред. Е.Н. Седов. Орел: ВНИИСПК; 2014).

Untergasser A., Nijveen H., Rao X., Bisseling T., Geurts R., Leunissen J.A.M. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research.* 2007;35(Iss. suppl. 2):71-74. DOI: 10.1093/nar/gkm306

Woodhead M., Smith K., McCallum S., Cardle L., Mazzitelli M., Graham J. Identification, characterization and mapping of simple sequence repeat (SSR) markers from raspberry root and bud ESTs. *Molecular Breeding* 2008;22(4):555-563. DOI: 10.1007/s11032-008-9198-y

Zhidekhina T.V. Dynamics of change in raspberry cultivar assortment due to success in breeding (Dinamika izmeneniya sortovogo sostava maliny v svyazi c uspekhami selektsii). In: N.M. Kruglov (ed.). *I.V. Michurin and agrotechnological aspects of fruits and vegetables production: proceedings of international scientific and practical conference (I.V. Michurin i agrotekhnologicheskie aspekty proizvodstva plodov i ovoshchey na sovremennom etape: materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii); 2005 September 28-30, Voronezh, Russia*. Voronezh: VSAU; 2005. p.103-108. [In Russian] (Жидехина Т.В. Динамика изменения сортового состава малины в связи с успехами селекции. В кн.: *И.В. Мичурин и агротехнологические аспекты производства плодов и овощей на современном этапе: материалы международной научно-практической конференции; 28-30 сентября 2005 г.; Воронеж, Россия* / под ред. Н.М. Круглова. Воронеж: ВГАУ; 2005. С.103-108).

Zhidekhina T.V. Formation of the scientific school for berry crop breeding in the I.V. Michurin ARIH (Formirovaniye nauchnoy shkoly po selektsii yagodnykh kul'tur vo VNIIS im. I.V. Michurina). In: Yu.V. Trunov (ed.). *Innovative fundamentals of Russian horticulture development (Innovatsionnye osnovy razvitiya sadovodstva Rossii)*. Voronezh: Kvarta; 2011a. p.41-48. [In Russian] (Жидехина Т.В. Формирование научной школы по селекции ягодных культур во ВНИИС им. И.В. Мичурина. В кн.: *Инновационные основы развития садоводства России* / отв. ред. Ю.В. Трунов. Воронеж: Кварта, 2011a. С.41-48).

Zhidekhina T.V. Improvement of raspberry cultivar assortment in the conditions of Tambov Region (Sovershenstvovaniye sortimenta maliny v usloviyakh Tambovskoy oblasti). In: *Achievements, prospects and directions of horticulture and nursery development in the Russian Federation: Proceedings of scientific and practical conference (Dostizheniya, perspektivy i napravleniya razvitiya sadovodstva i pitomnikovodstva v Rossiyskoy Federatsii: Materialy mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii); 2011 September 3-4; Michurinsk, Russia.* Michurinsk, Russia; 2011b. p.131-138. [In Russian] (Жидехина Т.В. Совершенствование сортимента малины в условиях Тамбовской области. В кн.: *Достижения, перспективы и направления развития садоводства и питомниководства в Российской Федерации: материалы научно-практической конференции; 3-4 сентября 2011 г.; Мичуринск, Россия*. Мичуринск-наукоград РФ; 2011b. С.131-138).

Информация об авторах

Антон Михайлович Камнев, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярной селекции и ДНК-паспортизации, отдел биотехнологии ВИР, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, antonkamen@mail.ru,https://orcid.org/0000-0001-8103-2191

Татьяна Владимировна Жидехина, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, заведующая отделом ягодных культур, заместитель директора по научной работе, Федеральный научный центр имени И.В. Мичурина, 393774 Россия, Тамбовская область, Мичуринск, ул. Мичурина, 30, berrys-m@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-9543-7069

Ольга Юрьевна Антонова, кандидат биологических наук, главный научный сотрудник, лаборатория молекулярной селекции и ДНК-паспортизации, отдел биотехнологии ВИР, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, olgaant326@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8334-8069

Светлана Ефимовна Дунаева, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, отдел биотехнологии ВИР, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, dunaevase@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-7002-8066

Ирена Георгиевна Чухина, кандидат биологических наук, главный научный сотрудник отдел агроботаники и *in situ* сохранения генетических ресурсов растений ВИР, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, irena_wir@mail.ru,https://orcid.org/0000-0003-3587-6064

Татьяна Андреевна Гаврилeнко, доктор биологических наук, главный научный сотрудник, отдел биотехнологии ВИР, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, tatjana9972@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0002-2605-6569

Information about the authors

Anton M. Kamnev, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Breeding and DNA passportization, Biotechnology Department, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, antonkamen@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8103-2191

Tatjana V. Zhidekhina, Cand. Sci. (Agriculture), Leading Researcher, Head, Berry Crops Department, Deputy Director for Science, I.V. Michurin Federal Scientific Center, 30, Michurin Street, Tambov Region, Michurinsk, 393774 Russia, berrys-m@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-9543-7069

Olga Yu. Antonova, Cand. Sci. (Biology), Chief Researcher, DNA-passportisation and Molecular breeding Laboratory, Biotechnology Department, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, olgaant326@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-8334-8069

Svetlana E. Dunaeva, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Biotechnology Department, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, dunaevase@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-7002-8066

Irena G. Chukhina, Cand. Sci. (Biology), Chief Researcher, Department of Agrobotany and *in situ* Conservation of Plant Genetic Resources, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, irena_wir@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-3587-6064

Tatjana A. Gavrilenko, Dr. Sci. (Biology), Chief Researcher, Biotechnology Department, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, tatjana9972@yandex.ru, https://orcid.org/0000-0002-2605-6569

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 12.07.2024; одобрена после рецензирования 27.08.2024; принята к публикации 19.09.2024.
The article was submitted on 12.07.2024; approved after reviewing on 27.08.2024; accepted for publication on 19.09.2024.

Научная статья
УДК 635.655:58.056:631.53.026:631.547.1
DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o6

(cc) BY

Всхожесть семян сои после низкотемпературного хранения и её зависимость от погодно-климатических условий в местах репродукции образцов

И. В. Сеферова, Г. И. Филипенко, О. Н. Забегаева, А.П. Бойко, А. Ю. Некрасов, Л. Ю. Новикова

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

Автор, ответственный за переписку: Галина Ивановна Филипенко, g.filipenko@vir.nw.ru

Актуальность. Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) является микробиотиком и при хранении семян в неконтролируемых условиях при комнатных температурах быстро утрачивает всхожесть, что определяет необходимость сохранения коллекционных образцов с использованием специальных приемов. Хранение при низких температурах (НХ) позволяет сохранить высокую всхожесть семян, но не в случае всех образцов. Это делает актуальным оценку результатов многолетнего сохранения образцов сои в Генбанке ВИР и предпринимаемую нами попытку определения лучших географических условий для их репродукции и получения семян, используемых для НХ. **Материалы и методы.** Работа выполнена на 312 образцах сои коллекции ВИР, происхождение которых охватывает практически весь ареал культивирования сои. Репродукция образцов осуществлялась на трех опытных станциях ВИР: Адлерской опытной станции, Кубанской опытной станции (Краснодарский край) и на Дальневосточной опытной станции (Приморский край). Использованы семена, полученные в период с 1999 по 2017 год, заложенные на НХ с 2002 по 2021 год. Семена хранили в запаянных ламинированных пакетах из алюминиевой фольги при температуре –10°С. Выемка образцов из НХ и оценка всхожести выполнена в 2022 году. **Результаты.** Всхожесть семян на момент закладки (G_i) составляла от 12 до 100% (среднее значение 79,1%), итоговая всхожесть (G_r) – от 1 до 97% (среднее 57,8%). Сохранение всхожести оценивали по индексу всхожести ($GI=G_r/G_i$), варьирующему от 0,02 до 1,73, при среднем значении 0,72. Все показатели всхожести в наблюдаемом нами диапазоне до 20 лет хранения не имели связи с продолжительностью хранения и с числом лет до закладки (в нашем опыте 0,5-4 года). Климатические условия в месте репродукции образцов оказали достоверное влияние на всхожесть до и после хранения, но не на *GI*. Средняя всхожесть перед закладкой семян, урожая АдлОС и КОС, не различалась достоверно (77,4% и 75,7%), а для семян, полученных на ДВОС была достоверно выше (84,0%). Всхожесть после хранения образцов ДВОС (64,3%) также была больше, чем таковых КОС (52,2%) и АдлОС (57,2%). Проявляющаяся в отдельные годы на всех станциях избыточно высокая сумма температур выше 10°С снижает G_i, G_r, но мало влияет на *GI*. Наиболее высокие значения начальной, итоговой всхожести и *GI* имели образцы, созревающие за 101–120 дней. Досушивание наиболее позднеспелых образцов (созревающих позднее 140 дней) в снопах под навесом позволяет получать семена с высокой всхожестью, хорошо переносящие НХ. **Заключение.** Семена разных мест репродукции различались по всхожести до и после НХ, и, в среднем, наивысшие значения характеризовали семена, полученные на Дальневосточной опытной станции, где температурный режим ближе к оптимальному для сои. Индекс всхожести семян показал относительную независимость от условий репродукции образцов, в том числе от климатических и погодных условий, а также от начальной всхожести и срока хранения семян.

***Ключевые слова*:** *Glycine max*, всхожесть, низкотемпературное хранение, климатические условия

Благодарности: Работа выполнена в рамках государственного задания № FGEM-2022-0002 «Выявление возможностей генофонда бобовых культур для оптимизации их селекции и диверсификации использования в различных отраслях народного хозяйства».

Для цитирования: Сеферова И.В., Филипенко Г.И., Забегаева О.Н., Бойко А.П., Некрасов А.Ю., Новикова Л.Ю. Всхожесть семян сои после низкотемпературного хранения и её зависимость от погодно-климатических условий в местах репродукции образцов. *Биотехнология и селекция растений*. 2024;7(3):42-52. DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o6

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.

© Сеферова И.В., Филипенко Г.И., Забегаева О.Н., Бойко А.П., Некрасов А.Ю., Новикова Л.Ю., 2024

Original article
DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o6

Germination of soybean seeds after low-temperature storage and its dependence on weather and climate conditions in the places of reproduction of accessions

Irina V. Seferova, Galina I. Filipenko, Olga N. Zabegaeva, Alexander P. Boyko, Alexander Yu. Nekrasov, Lyubov Yu. Novikova

N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia

Corresponding author: Galina I. Filipenko, g.filipenko@vir.nw.ru

Background. Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) is a microbiotic whose seeds quickly lose germination in uncontrolled conditions at room temperatures. This determines the need to preserve accessions in special conditions. Low temperature storage (LTS) allows to maintain high seed germination ability, but not for all accessions. Therefore, it is relevant to assess the results of LTS at the VIR Genebank and to make an attempt to determine the best geographical conditions for growing plants and harvesting seeds that will be subjected to LTS. **Materials and methods.** The work was carried out on 312 soybean accessions from the VIR collection, originating from almost the entire area of soybean cultivation. The accessions used in the research were reproduced at three VIR experiment stations (ES), namely Adler ES, Kuban ES (Krasnodar Territory) and the Far East ES (Primorsky Territory). The seeds were harvested in 1999 to 2017 and stored in sealed foil laminated bags at –10°C from 2002 to 2021. The accessions were removed from LTS and germination assessed in 2022. **Results.** At the beginning of LTS, seed germination (G_i) ranged from 12 to 100% (averaging 79.1%), while that after LTS (G_r) ranged from 1 to 97% (57.8% on average). The retention of germination ability was expressed as the germination index ($GI = G_r / G_i$), which ranged from 0.02 to 1.73 (an average of 0.72). All the indicators of germination in the range of up to 20 years of LTS were not associated with the duration of LTS and with the number of years before LTS (0.5-4 years in our research). The climatic conditions characteristic of the place of reproduction had a significant impact on G_i and G_r, but not on *GI*. The average G_i of seeds obtained at the Adler ES and Kuban ES did not differ significantly (77.4% and 75.7%), while that of seeds harvested at the Far East ES was significantly higher (84.0%). G_r of the accessions from the Far East ES (64.3%) was also greater than that of accessions from the Kuban ES (52.2%) and Adler ES (57.2%). The excessively high sum of temperatures above 10°C (recorded in some years at all stations) reduced G_i, G_r but had little effect on *GI*. The highest values of G_i, G_r, and *GI* were demonstrated by the accessions maturing in 101-120 days. Additionally drying of the most late-ripening accessions (later than 140 days) in sheaves under an awning yielded seeds with high germination ability and good LTS tolerance. **Conclusion.** The seeds from different places of reproduction of accessions differed in germination before and after LTS, and, on an average, the highest values were demonstrated by the seeds harvested at the Far East ES, where the temperature regime is closer to the optimal one for soybeans. The seed germination index showed relative independence from the conditions of reproduction of accessions, including the climate and weather conditions, as well as the initial germination ability and LTS duration.

Keywords: *Glycine max*, germination, low-temperature storage, climatic conditions

Acknowledgements: The work was carried out within the framework of State Assignment 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”.

For citation: Seferova I.V., Filipenko G.I., Zabegaeva O.N., Boyko A.P., Nekrasov A.Yu., Novikova L.Yu. Germination of soybean seeds after low-temperature storage and its dependence on weather and climate conditions in the places of reproduction of accessions. *Plant Biotechnology and Breeding.* 2024;7(3):42-52. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o6

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.

© Seferova I.V., Filipenko G.I., Zabegaeva O.N., Boyko A.P., Nekrasov A.Yu., Novikova L.Yu., 2024

Введение

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) является микробиотиком, и при хранении семян в неконтролируемых условиях при комнатных температурах быстро утрачивает всхожесть, что определяет необходимость сохранения коллекционных образцов с использованием специальных приемов. Семена сои относят к ортодоксальному типу, что позволяет сохранять их длительное время при пониженной влажности и низких температурах (Pritchard, Dickie, 2003; Solberg et al., 2020). Но, несмотря на накопленный к настоящему времени опыт хранения семян, не удаётся сохранить высокую всхожесть семян разного происхождения, заложенных на длительное низкотемпературное хранение (Solberg et al., 2020), так как и в этих условиях неизбежно происходит старение семян и снижение их всхожести.

У разных видов культурных растений прослеживаются различия по способности к длительному сохранению всхожести семян в зависимости от региона происхождения, степени окультуренности, различий в молекулярно-генетических характеристиках семян (Yamasaki et al., 2020; Kalemba et al., 2023). В ряде работ выявлена внутривидовая изменчивость по способности к сохранению всхожести семян, обусловленная генотипическими различиями (Safina, Filipenko, 2013; Solberg et al., 2020).

На сохранение всхожести сильно влияют условия получения семян, поскольку практически всегда семена лучшего качества обладают и лучшей способностью к хранению (De Vitis, 2020). Для большинства видов, в том числе и сои, качество семян явно зависит от условий среды в промежутке от полного налива семян до уборочной зрелости (Ellis, 2019). Для сои оптимальными температурами в этот период являются среднесуточные температуры 18-22ºС и дневные температуры не выше 28ºС, однако этот параметр варьирует и зависит от генотипа. Более жаркие условия создают температурный стресс, снижают урожай семян и их всхожесть (Степанов, 1957; Chebrolu et al., 2016; Nakagawa et al., 2020). Ухудшать качество семян сои и их способность к сохранению всхожести может и перестой растений в поле после полного созревания (Tekrony et al., 1980; Solberg et al., 2020; Rao et al., 2023). С использованием методов генетического маркирования и обратной генетики начаты исследования по идентификации генетических факторов, вовлеченных в контроль этого признака (Renard et al., 2020; Arif et al., 2023). У сои различия образцов по способности к сохранению всхожести могут быть связаны с генетическими факторами, определяющими различия в хрупкости семян при низких температурах (Ballesteros, Walters, 2019)

Поскольку все исследования замедляются необходимостью оценки семян после десятилетий хранения в выбранных условиях, данные накапливаются не очень быстро. Это делает актуальными оценку результатов многолетнего сохранения образцов сои в Генбанке ВИР и предпринимаемую нами попытку выяснения некоторых из причин, определяющих снижение всхожести семян при низкотемпературном хранении (НХ). Целью нашего исследования была проверка сохранения всхожести семян у образцов сои при НХ в Генбанке ВИР в Санкт-Петербурге и оценка влияния на результаты хранения условий репродукции образцов. Результаты могут быть полезными для дальнейшей оптимизации условий сохранения коллекционного материала.

Материалы и методы

Работа выполнена на 312 образцах сои коллекции ВИР. Образцы представляют собой селекционные и местные сорта и селекционный материал, происхождение которых охватывает практически весь ареал культивирования сои, в том числе Австралию (3 образца), Алжир (6), Аргентину (1), Бельгию (2), Болгарию (3), Бразилию (1), Венгрию (6), Германию (3), Италию (1), Канаду (37), Китай (52), КНДР (4), Колумбию (1), Кыргызстан (1), Литву (1), Молдову (17), Нидерланды (1), Польшу (1), Португалию (1), Румынию (1), Сирию (1), США (49), Узбекистан (2), Украину (9), Филиппины (2), Францию (13), Чехию (3), Словакию (8), Швецию (1), Югославию (2), Южную Корею (15), и Японию (33). Изученные образцы российской селекции происходят из Азиатской (27) и Европейской (4) частей России.

Семена образцов, заложенные на НХ, были получены на трех опытных станциях ВИР: 83 образца на Адлерской опытной станции (АдлОС), 108 на Дальневосточной опытной станции (ДВОС), 120 на Кубанской опытной станции (КОС). Повторов одного и того же образца, репродуцированных на разных станциях, не было включено в изучение. Места получения семян находятся в контрастных климатических условиях:

I. АдлОС (Краснодарский край, Черноморское побережье Кавказа, г. Сочи, 43°26’ с. ш. 39°54’ в. д.) – влажный субтропический климат;

II. КОС (Краснодарский край, Гулькевичский район, 45°13’ с. ш. 40°47’ в. д.) – умеренный, континентальный;

III. ДВОС (Приморский край, г. Владивосток, 43°14’ с. ш. 132°03’ в. д.) – умеренный муссонный.

Соя является однолетней самоопыляющейся культурой, репродукцию которой осуществляют без применения изоляторов. Посев выполняют весной, при прогреве почвы до 10-12°С.

Для оценки влияния погодно-климатических показателей на качество семян использованы значения среднемесячных температур, месячных сумм осадков, характеристик периода с температурами выше 10°С – средних температур, сумм осадков ($\sum P_{10}$), сумм температур ($\sum T_{10}$).

В 1999–2017 годах самые высокие летние температуры наблюдались на АдлОС, самые низкие – на ДВОС, наибольшим количеством осадков характеризовалась АдлОС, наименьшим – КОС (рис. 1). Суммы температур выше 10°С ($\sum T_{10}$) составили, в среднем, 4568°С на

АдлОС, 3732°C на КОС, 2444°C на ДВОС; суммы осадков за период с температурами выше 10°C ($\sum P_{10}$) – 1026 мм, 405 мм и 603 мм, соответственно. Средние температуры за этот период составили 18,5°C; 19,1°C и 16,4°C, соответственно[1].

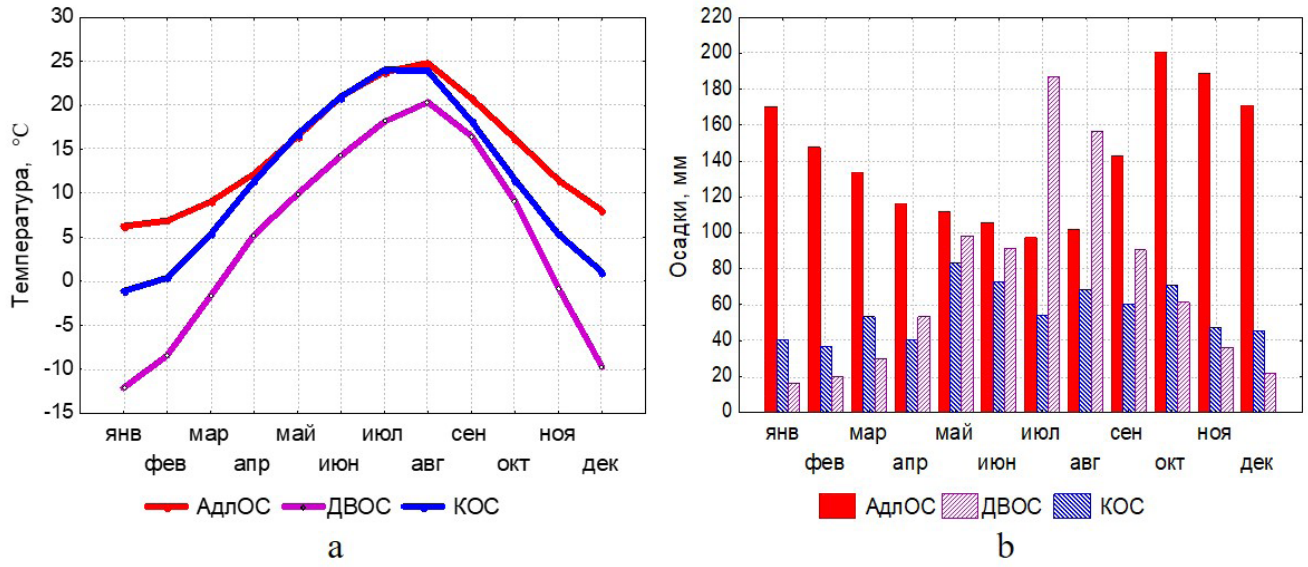


Рис. 1. Среднемесячные температура воздуха (a) и суммы осадков (b) на опытных станциях ВИР за период 1999-2017 годов

Fig. 1. Average monthly temperatures (a) and the sum of the precipitation (b) at the Experiment Stations of VIR in 1999-2017

Experiment Stations (ES): АдлОС – Adler ES, ДВОС – Far East ES, КОС – Kuban ES

Распределение образцов для пересева на станциях осуществлялось исходя из местных погодно-климатических условий. Учитывали, что самые позднеспелые образцы могут вызревать только на АдлОС, а самые скороспелые дают семена лучшего качества на ДВОС, но их пересев возможен и на других станциях. Среднеспелые образцы могут успешно пересеваться на любой из этих станций. Уборку коллекционных образцов выполняли по мере созревания семян. Самые позднеспелые образцы на стадии начала созревания собирали в снопы, которые затем размещали под навесом, так как полное созревание на поле не могло быть достигнуто. Обмолачивали только подсушенные снопы.

Образцы характеризовались различной продолжительностью периода всходы-созревание ($L_{g\text{-}m}$) и, соответственно, различные погодные условия требовались для завершения их вегетации. Оценку использованных для анализа значений $L_{g\text{-}m}$ непосредственно при выращивании использованных в опыте семян не производили, данные были взяты из опубликованных каталогов ВИР, основывающихся на средних за три года результатах изучения на разных опытных станциях[2]. Продолжительность созревания известна для 256 образцов из исследуемых 312.

Кроме собственно климатических показателей, на качество семян могли оказывать влияние специфические приемы агротехники и уборки, отличающиеся на разных станциях. Учитывая, что посевы были предназначены для обновления семян в коллекции, а не для детального изучения, четкой фиксации этих приемов по годам не велось, что не позволяет использовать их в анализе.

Всхожесть семян на момент закладки составляла от 12% до 100%. Низкая начальная всхожесть части образцов обусловила закладку их на среднесрочное, а не на длительное хранение. Использованы семена репродукции 1999-2017 годов. От получения семян до их закладки на НХ проходило от 0,5 до 4 лет, в том числе от 0,5 до 1 года (68 образцов), до 2-х лет (167), до 3-х (70), до 4-х (7). Продолжительность хранения составляла от 1 до 20 лет (в среднем 12 лет). Число лет, в течение которых осуществляли репродукцию образцов для получения семян,

[1] Использованы данные метеопункта КОС, метеостанций Сочи (WMO: 37099) и Владивостока (WMO: 31960) с официального сайта Росгидромета ВНИГМИ-Мирового центра данных (http://meteo.ru/)

[2] Каталоги мировой коллекции ВИР: вып.96 (1972), вып.115 (1973), вып. 116 (1973), вып. 292 (1980), вып. 555 (1990), вып. 717 (2000), вып. 782 (2008), вып. 817 (2014), вып. 855 (2018), вып. 905 (2019), вып. 911 (2020), вып. 939 (2022)

использованных в данном исследовании, составило на АдлОС – 14 лет, КОС – 17, ДВОС – 13.

Подготовку образцов семян к закладке на НХ проводили в соответствии с действовавшими на момент закладки Стандартами для генбанков (Genebank standards…, 1994; Genebank standards…, 2014): семена были подсушены до влажности 5,1–6,6%, что попадало в рекомендованный стандартами интервал влажности 3–7%. Исходная всхожесть образцов (G_i) была оценена на момент закладки на НХ, до их подсушивания. Семена хранились в ламинированных герметичных пакетах при отрицательных температурах (-10°C). Выемка образцов была выполнена весной 2022 года, после чего была определена итоговая всхожесть после НХ (G_r). Всхожесть и влажность семян сои определяли по ГОСТам (GOST 12038-84, 2011; GOST 12041-82, 2011).

Статистический анализ проведен в программе Excel 2016 и с использованием пакета Statistica 13.3. Нормальность распределения проверена с помощью критерия Шапиро-Уилка. Показано, что распределение G_i, G_r, *GI* отличается от нормального ($p<0,001$). Поэтому были использованы непараметрические критерии. Для сравнения всхожести до и после хранения использовали критерий Вилкоксона, корреляции рассчитаны по Спирмену. Оценка зависимости всхожести семян от места репродукции произведена с помощью критерия Краскела-Уоллиса. В исследовании принят уровень значимости 5%.

Мониторинг изменения всхожести семян по международным стандартам рекомендуется проводить по отношению итоговой всхожести к исходной (Genebank standards…, 1994; Genebank standards …, 2014). Для обозначения этой пропорции используют процент от начальной всхожести (Storozheva, 2006) или индекс всхожести (*GI* – germination index) (Karim et al.,, 1992; Kandil et al., 2013), который мы и применили в данном исследовании:

$$GI = \frac{G_r}{G_i}$$, где

G_i – исходная всхожесть до НХ (initial germination), %;

G_r –итоговая всхожесть после НХ (resulting germination), %.

Результаты

Связь показателей всхожести при хранении на –10°C. Исходная всхожесть (G_i) варьировала от 12 до 100% (рис. 2), среднее значение 79,1%, стандартное отклонение 15,5%, коэффициент вариации 19,6%. Итоговая всхожесть (G_r) варьировала в пределах 1 и 97%, среднее 57,8%, стандартное отклонение составило 23,4%, коэффициент вариации – 40,6%. Таким образом, G_r варьирует больше, чем G_i. С помощью критерия Вилкоксона мы показали достоверность снижения всхожести после хранения. *GI* варьировал от 0,02 до 1,73, при среднем значении 0,72.

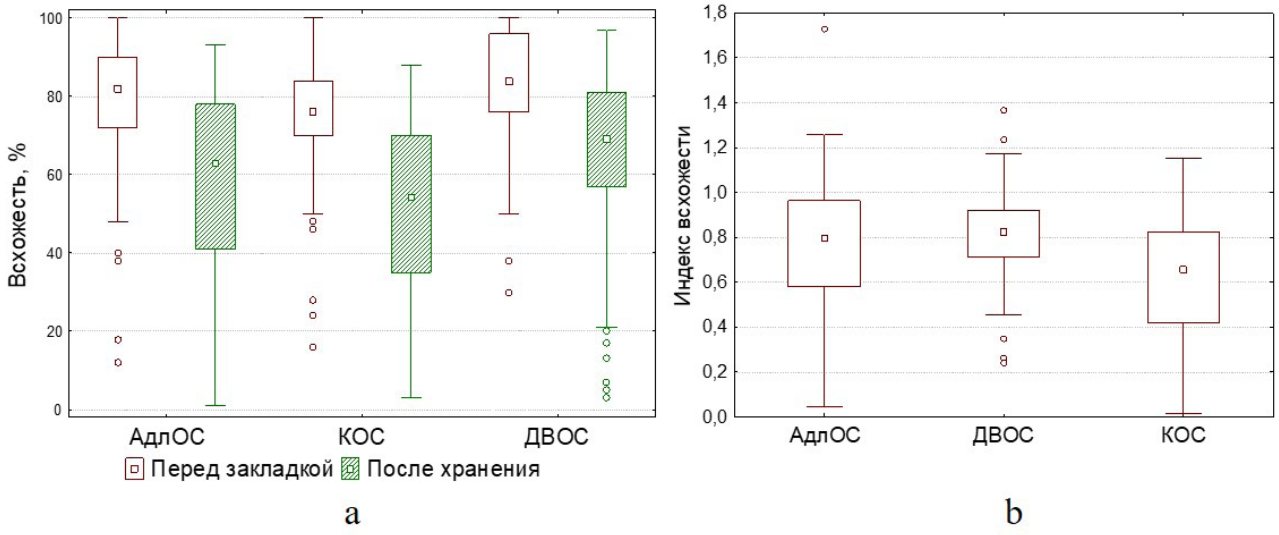


Рис. 2. Диаграммы размаха показателей всхожести семян сои при длительном хранении на –10°C в зависимости от мест репродукции образцов

a – всхожесть; b – индекс всхожести. На диаграммах представлены: медиана, квартили, размах без выбросов, выбросы

Fig. 2. Box plots of soybean seed germination during long-term storage at –10°C, depending on the places of reproduction of accessions

a – germination; b – Germination Index. The box plots show: median, quartiles, range without outliers, outliers

Корреляционный анализ показал, что всхожесть после хранения была достоверно связана с всхожестью до хранения, но сила связи была невысокой (r=0,58). *GI* слабо коррелировал с G_i (r=0,15) и был связан прежде всего с G_r (r=0,84), что показывает отсутствие явного преимущества образцов с более высокой G_i по способности сохранять всхожесть. Данное наблюдение было проверено определением *GI* отдельно для образцов с высокой начальной всхожестью. По «Genebank standards…» (Genebank standards…, 2014) на долгосрочное хранение допускается закладывать только образцы с G_i>85%. Таких образцов в изучаемом наборе было 101. Границей сохранения генетической целостности образца считается сохранение 85% всхожести от G_i, то есть *GI* должен быть не меньше 0,85. В изучаемом наборе такую всхожесть сохранили 37 образцов из 101, то есть только 36,6% образцов. Показатель G_r у образцов с высокой начальной всхожестью варьировал от 16% до 97%. Среднее значение *GI* для образцов с G_i больше 85% достоверно не отличалось (p=0,091) от среднего для образцов с G_i меньше 85%. Таким образом, сохранение всхожести семенами, способными прорастать на момент закладки на НХ, не зависит от их доли в общем массиве семян в образце.

Все показатели всхожести в наблюдаемом нами диапазоне до 20 лет хранения имели слабую корреляцию (r<0,3) с продолжительностью хранения и с числом лет до закладки.

Показатели всхожести семян из разных мест репродукции. Место репродукции образцов оказало достоверное влияние на всхожесть семян до и после хранения, но не на индекс всхожести (по критерию Краскела-Уоллиса p=0,051). Средняя всхожесть до закладки у семян, полученных на АдлОС и КОС, не различалась достоверно (77,4% и 75,7%, p=0,290), а для семян урожая ДВОС была достоверно выше (84,0%, p<0,028 при сравнении с двумя другими станциями). По всхожести после хранения достоверно различались образцы КОС с наименьшим значением (52,2%) и ДВОС с наибольшим (64,3%). Семена образцов, репродуцированных на АдлОС, имели промежуточную всхожесть (57,2%), которая не отличалась достоверно от таковой семян, полученных на двух других станциях (p>0,136). Таким образом, лучшими для хранения были семена, собранные на ДВОС, несмотря на то, что семена, полученные на ДВОС и КОС хранились в среднем дольше (13 лет), чем собранные на АдлОС (10 лет).

Погодно-климатические зависимости показателей всхожести. Широкий диапазон погодно-климатических условий, в которых на трёх станциях созревали семена перед закладкой, позволил оценить связи средних за год показателей всхожести семян (G_i, G_r и *GI*) и условий сезона выращивания образцов. Корреляционный анализ показал, что из всех исследованных метеорологических показателей самые сильные связи в каждом пункте исследования были у G_i с суммой температур выше 10°C, варьируя от –0,50 до –0,63 (табл. 2, рис. 3). Это может быть интерпретировано как негативное воздействие избыточно высоких температур. С $\sum P_{10}$ показатели всхожести (G_i, G_r и *GI*) не проявляли достоверных корреляций.

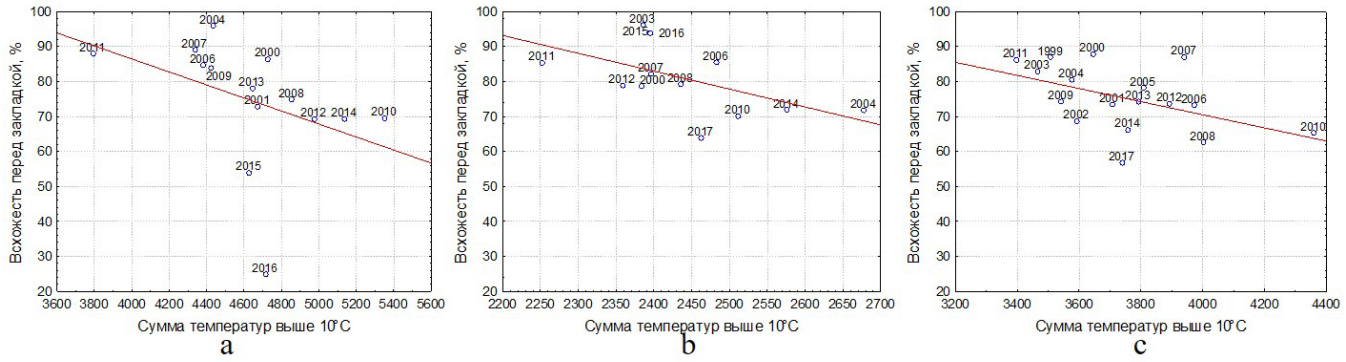


Рис. 3. Зависимость всхожести семян сои от сумм температур выше 10°C
a – Адлерская ОС ВИР; b – Дальневосточная ОС ВИР; c – Кубанская ОС ВИР

Fig. 3. Dependence of soybean seed germination on the sum of active temperatures above 10°C
a – Adler Experiment Station; b – Far East Experiment Station; c – Kuban Experiment Station

Таблица 2. Коэффициенты корреляции климатических показателей и характеристик всхожести семян сои различных мест репродукции

Table 2. Correlation coefficients between climatic indicators and characteristics of germination of soybean seeds harvested in different places of reproduction

Показатель/ Indicator	Место репродукции/ Place of reproduction	Всхожесть перед закладкой на хранение/ Germination before storage	Всхожесть после хранения/ Germination after storage	Индекс всхожести/ Germination index
Сумма температур выше 10°C	АдлОС	–0,63*	–0,49	–0,13
	ДВОС	–0,51	–0,37	–0,10
	КОС	–0,50*	–0,55*	–0,48
Сумма осадков за период с температурами выше 10°C	АдлОС	–0,28	–0,14	–0,22
	ДВОС	0,02	–0,01	0,22
	КОС	–0,16	–0,14	–0,12

*обозначены значимые корреляции

Показатели всхожести семян образцов разных сроков созревания. Учитывая, что условия созревания семян зависят не только от географического расположения места репродукции, но и от времени созревания, данные были проанализированы в привязке к продолжительности вегетации ($L_{g\text{-}m}$). У самых скороспелых образцов $L_{g\text{-}m}$ составляла 81-90 дней, а у самых позднеспелых могла превышать 150 дней. Средняя продолжительность $L_{g\text{-}m}$ изучаемых образцов была наибольшей на АдлОС (133 суток), достоверно превышая продолжительность на ДВОС и КОС (122–123 суток), а ДВОС и КОС достоверно не различались по этому показателю (p=0,996). Созревание самых скороспелых образцов за годы изучения начиналось на ДВОС с последних чисел августа, на АдлОС и КОС с середины августа и завершалось на ДВОС и КОС к концу октября, а на АдлОС для наиболее позднеспелых образцов могло затягиваться до конца ноября. Корреляционный анализ показал, что значимая корреляция показателей всхожести и продолжительности вегетации имеется только в случае G_i для образцов АдлОС, r=0,42. У остальных показателей всхожести семян, воспроизводимых на станциях, линейная связь с продолжительностью вегетации отсутствовала, коэффициенты корреляции варьировали от –0,20 до 0,25. Однако анализ графиков зависимости показателей всхожести от продолжительности вегетационного периода выявил наличие нелинейной тенденции. Нелинейная зависимость была проанализирована сравнением групп образцов с разной продолжительностью вегетации с помощью критерия Краскела-Уоллиса. Образцы были разбиты на группы по продолжительности вегетации с интервалом 20 суток. Средние значения показателей качества семян образцов, разделенных на четыре группы по срокам созревания, отображены на графиках (рис. 4). Всхожесть перед закладкой по совокупности данных с трех станций была наибольшей у самых поздних образцов с $L_{g\text{-}m}$ >140 суток (86,7%), достоверно превышая всхожесть в остальных группах: <101 суток (72,3%), 101-120 суток (78,6%), 121-140 (77,4%).

Всхожесть после хранения также была наибольшей у наиболее поздних образцов $L_{g\text{-}m}$>140 суток (66,9%), достоверно превышая значения в группе с наименьшей всхожестью, созревающих за 121-140 суток (49,9%). Кроме того, высокая всхожесть была в группе созревающих за 101–120 суток (61,5%), что было достоверно выше, чем в группе созревающих за 121-140 суток. Группа образцов с вегетационным периодом короче 101 суток имела среднее значение всхожести (53,9%) и достоверно от других групп не отличалась (p>0,183).

По индексу всхожести образцы семян с $L_{g\text{-}m}$, созревающих за 121-140 суток, имели *GI* достоверно ниже (0,6), то есть эти семена хуже хранились, чем созревающие за меньшее и большее число дней: индекс *GI* в группах созревания 101-120 суток (0,8) и >140 суток (0,8) был достоверно выше. Группа <101 суток характеризовалась средним значением *GI* (0,7) и от других по этому показателю достоверно не отличалась (p=1).

Обсуждение

В разных генбанках могут применяться несколько различающиеся режимы подготовки семян и их хранения. Обычно используют принудительную сушку и герметичную упаковку. Для образцов сои, имеющих высокую начальную всхожесть, сохранение всхожести на уровне генетической целостности, то есть сохранение начальной всхожести более 85%, наблюдалось при хранении в среднем в течение 25,5 лет при –18°C (Desheva et al., 2017) и в течение 30 лет при –20°C (Kiran Babu et al., 2018). При хранении при +4°C, заметное снижение всхожести зарегистрировано начиная с 20 лет хранения (Silaeva, 2012). Наши результаты показали, что в Генбанке ВИР за меньшее число лет (от 4 до 20) из образцов сои с высокой начальной всхожестью (>85%), сохранили всхожесть на

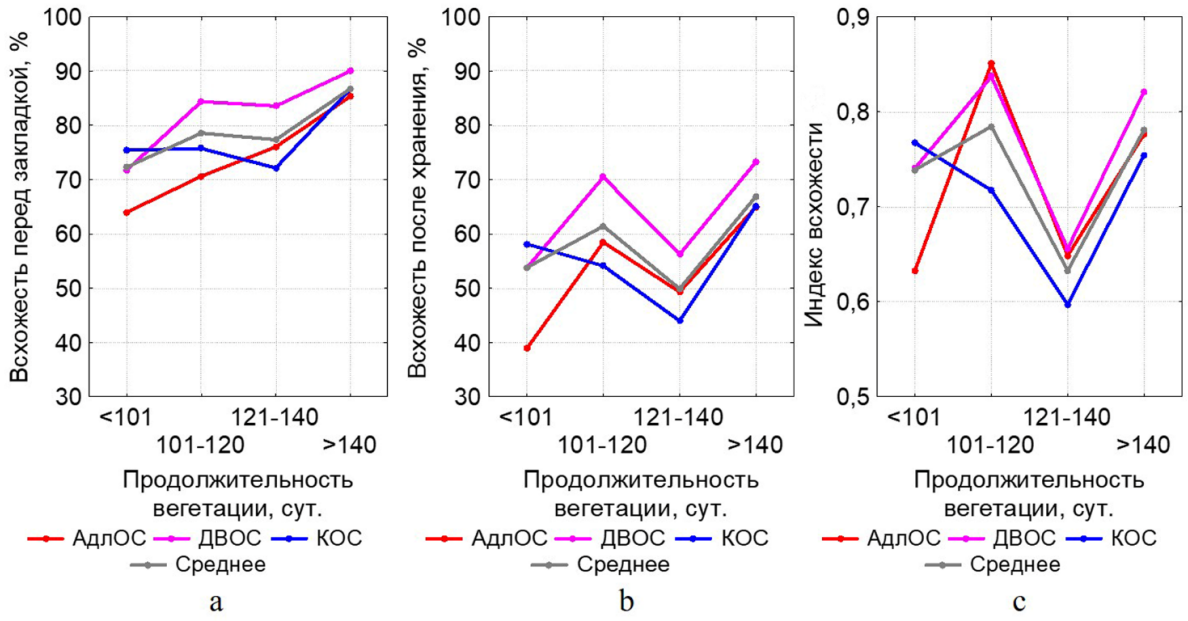


Рис. 4. Всхожесть семян сои в зависимости от мест репродукции образцов и их скороспелости

a – всхожесть перед закладкой на хранение; b – всхожесть после хранения при –10°C; c) индекс всхожести

Fig. 4. Soybean seed germination depending on the places of reproduction of the accessions and the time of their maturation

a) germination before storage; б) germination after storage at –10°C; c) Germination Index

АдлОС – Adler Experiment Station; ДВОС – Far East Experiment Station;

КОС – Kuban Experiment Station

уровне генетической целостности только 36% образцов. Это определяет высокую актуальность совершенствования как методов хранения, так и способов подготовки семенного материала.

Центр происхождения культурной сои находится на северо-востоке Китая в южной части зоны умеренного климата с муссонным режимом выпадения осадков (Vavilov, 1960). Установлено, что для успешного роста соя нуждается в теплых, но не жарких, условиях и в достаточном количестве увлажнения.

При сравнении показателей всхожести семян образцов, репродуцированных на АдлОС, ДВОС и КОС показано, что G_i и G_r имеют лучшие показатели у семян, полученных на ДВОС. Эта территория подходит для поддержания всхожести всех коллекционных образцов сои, кроме самых позднеспелых (Novikova et al., 2020). Результаты нашего исследования подтверждают ранее полученные в ВИР результаты (Silaeva, 2012) о более успешном НХ семян сои, выращенных в Приморском крае на ДВОС, чем в Краснодарском крае на КОС. *GI* не проявил достоверной зависимости от места репродукции образцов сои.

Всхожесть после хранения была достоверно связана с всхожестью до хранения, но сила связи была невысокой (r=0,58). *GI* слабо коррелировал с G_i (r=0,15) и был связан прежде всего с G_r (r=0,84), что показывает отсутствие явного преимущества образцов с более высокой G_i по способности сохранять всхожесть. Таким образом, сохранение всхожести семенами, всхожими на момент закладки на НХ, не зависит от их доли в общем массиве семян в образце. Отсутствие прямой связи между начальной всхожестью и способностью к сохранению всхожести наблюдалась и у других растительных видов (Teplykh, Prokhorova, 2018).

Погодно-климатическим фактором, снижающим G_i и G_r, является проявляющаяся в отдельные годы на всех станциях избыточно высокая $\sum T_{10}$. Соя имеет достаточно узкий температурный оптимум, он составляет 18-22°C (Stepanov, 1957; Chebrolu et al., 2016; Nakagawa et al., 2020). Лучшие условия ДВОС определяются более низкими значениями $\sum T_{10}$ по сравнению с условиями Краснодарского края, где выпадает достаточное для сои количество осадков, но значения $\sum T_{10}$ слишком высокие.

Выявлена зависимость показателей всхожести от сроков созревания. Высокие значения начальной, итоговой всхожести и *GI* имели образцы, созревающие за 101-120 дней. Это показывает, что погодные условия конца лета-начала осени благоприятны для созревания семян сои. Образцы, созревающие позже, за 121-140 дней, имели меньшие значения *GI*, при относительно высокой G_i. В этот период в поле растения на стадии созревания подвержены влиянию понижающихся температур и избыточных осадков. Более высокое качество семян образцов созревавших позднее 140 дней, объясняется тем, что их

собирали в снопы на стадии начала созревания. Дозаривание образцов под навесом позволяет семенам дозреть и предохраняет от неблагоприятного влияния осадков при возможной задержке с уборкой (Solberg et al., 2020; Rao et al., 2023).

Отрицательное влияние высоких температур на показатели всхожести семян на опытных станциях Краснодарского края, КОС и АдлОС, в последующие годы в связи с изменением климата может возрасти (Novikova et al., 2020). Это определяет желательность приоритетного размещения посевов и репродукции большей части образцов сои на ДВОС. Позднеспелые образцы, не вызревающие на ДВОС, могут пересеваться на КОС и АдлОС.

Обсуждая перспективные направления в изучении влияния различных факторов на всхожесть семян при низкотемпературном хранении, отметим, что в последние годы в этих исследованиях стали использоваться современные биохимические и молекулярно-генетические методы, а также геномные подходы. У сои различия образцов по способности сохранять всхожесть семян во время хранения могут быть связаны с генотипическими факторами, определяющими различия в хрупкости семян при низких температурах (Ballesteros, Walters, 2019), в структуре и целостности семенной кожуры, в скорости окисления липидов, эффективности систем репарации ДНК, в механизмах удаления свободных радикалов (Rao et al., 2023). Генотипические факторы, вовлеченные в контроль признака способности к сохранению всхожести семян у разных видов растений, стало возможным исследовать с использованием методов генетического маркирования, анализа полногеномных ассоциаций и обратной генетики (Nagel et al., 2015; Renard et al., 2020; Arif et al., 2023). В дальнейшем мы планируем изучить влияние как генотипических особенностей образцов сои, так и условий их репродукции, оказывающих комплексное влияние на способность семян к сохранению всхожести.

Заключение

Лучшие показатели всхожести перед закладкой и после хранения при –10°С, показывают, в среднем, семена, полученные в Приморском крае на ДВОС. Именно эта станция может считаться предпочтительной для воспроизведения большей части образцов сои.

Среднее отношение всхожести семян после хранения при –10°С к всхожести перед закладкой оказалось близким к постоянному значению 0,72 для сортов сои и не зависело от места их репродукции, продолжительности хранения, продолжительности времени до закладки и исходной всхожести. Всхожесть после НХ положительно, но не сильно связана с исходной всхожестью, то есть сохранение всхожести семенами, всхожими на момент закладки на НХ, не зависит от их доли в общем массиве семян в образце.

Всхожесть перед и после хранения была отрицательно связана с избыточными суммами активных температур. Способность сохранять всхожесть зависит и от сроков созревания. Из полностью созревающих в поле лучшие показатели имели образцы с продолжительностью вегетации 101–120 дней, а худшие – более скороспелые и более позднеспелые образцы. Прием уборки позднеспелых образцов на стадии начала созревания с последующим досушиванием в снопах под навесом позволяет получать семена с высокой всхожестью, способные успешно сохранять всхожесть при низкотемпературном хранении.

Выявленные зависимости сохранения всхожести семян сои от условий репродукции образцов позволят более эффективно планировать посевы коллекционных образцов и могут быть полезными при генетическом маркировании признака.

References/Литература

Arif M.A.R., Tripodi P., Waheed M.Q., Afzal I., Pistrick S., Schütze G., Börner A. Genetic analyses of seed longevity in *Capsicum annuum* L. in cold storage conditions. *Plants*. 2023;12:1321. DOI: 10.3390/plants12061321

Ballesteros D., Walters C. Solid-state biology and seed longevity: a mechanical analysis of glasses in pea and soybean embryonic axes. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:920. DOI: 10.3389/fpls.2019.00920

Chebrolu K.K., Fritschi F.B., Ye S., Krishnan H.B., Smith J.R., Gillman J. D. Impact of heat stress during seed development on soybean seed metabolome. *Metabolomics*. 2016;12:28. DOI: 10.1007/s11306-015-0941-1

De Vitis M., Hay F.R., Dickie J.B., Trivedi C., Choi J., Fiegener R. Seed storage: maintaining seed viability and vigor for restoration use. *Restoration Ecology*. 2020;28(S3):249-255. DOI: 10.1111/rec.13174

Desheva G., Petrova S., Deshev M. Germinability of soybean seeds stored more than 30 years in the Bulgarian national seed genebank. *World Scientific News*. 2017;69:29-46.

Ellis R.H. Temporal patterns of seed quality development, decline, and timing of maximum quality during seed development and maturation. *Seed Science Research*. 2019;29:135-142. DOI: 10.1017/ S0960258519000102

Genebank standards for plant genetic resources for food and agriculture. Rome: FAO; 2014. Available from: https://www.fao.org/4/i3704e/i3704e.pdf [accessed Jun. 21, 2024]

Genebank Standards. 1994. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome: International Plant Genetic Resources Institute; 1994. Available from: https://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/images/file/learning_space/genebank_standards.pdf [accessed June 21, 2024].

GOST 12038-84. Agricultural seeds. Methods for determination of germination. Moscow: Standartinform; 2011. [in Russian] (ГОСТ 12038-84. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения всхожести. Москва: Стандартинформ; 2011).

GOST 12041-82. Seed of farm crops. Method for determination of moisture content. Moscow: Standartinform; 2011. [in Russian] (ГОСТ 12041-82. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения влажности. Москва; 2011).

Kalemba E.M., Corbineau F., Kumar S.P.J. Editorial: Molecular basis of seed longevity. *Frontiers in Plant Science*. 2023;14:1138139. DOI: 10.3389/fpls.2023.1138139

Kandil A.A., Sharief A.E., Sheteiwy M.S. Effect of seed storage periods, conditions and materials on germination of some soybean seed cultivars. *American Journal of Experimental Agriculture*. 2013;3(4):1020-1043. DOI: 10.9734/AJEA/2013/3590

Karim M.A., Utsunomiya N., Shigenaga S. Effect of sodium chloride on germination and growth of hexaploid triticale at early seedling stage. *Japanese Journal of Crop Science*. 1992;61:279-284. DOI: 10.1626/jcs.61.279

Kiran Babu P., Radhamani J., Aravind J., Varghese E., Tyagi R.K. Field performance of 30-year-old soybean germplasm conserved in Indian National Genebank. *Plant Genetic Resources*.

2018;31(2):152-163. DOI: 10.5958/0976-1926.2018.00018.9
Nagel M., Kranner I., Neumann K., Rolletschek H., Seal C.E., Colville L., Fernández-Marín B., Börner A. Genome-wide association mapping and biochemical markers reveal that seed ageing and longevity are intricately affected by genetic background and developmental and environmental conditions in barley. *Plant, Cell & Environment*. 2015;38(6):1011-1022. DOI: 10.1111/pce.12474
Nakagawa A.C.S., Ario N., Tomita Y., Tanaka S., Murayama N., Mizuta C., Iwaya-Inoue M., Ishibashi Y. High temperature during soybean seed development differentially alters lipid and protein metabolism. *Plant Production Science*, 2020;23(4):504-512. DOI: 10.1080/1343943X.2020.1742581
Novikova L.Y., Bulakh P.P., Nekrasov A.Y., Seferova I.V. Soybean response to weather and climate conditions in the Krasnodar and Primorye territories of Russia over the past decades. *Agronomy*. 2020;10(9):1278. DOI: 10.3390/agronomy10091278
Pritchard H.W., Dickie J.B. Predicting seed longevity: the use and abuse of seed viability equations. In book: *Seed Conservation: Turning Science into Practice*. UK: Royal Botanic Gardens Kew; 2003.
Rao P.J.M., Pallavi M., Bharathi Y., Priya P.B., Sujatha P., Prabhavathi K. Insights into mechanisms of seed longevity in soybean: a review. *Frontiers in Plant Science*. 2023;14:1206318. DOI: 10.3389/fpls.2023.1206318
Renard J., Niñoles R., Martínez-Almonacid I., Gayubas B., Mateos-Fernández R., Bissoli G., Bueso E., Serrano R., Gadea J. Identification of novel seed longevity genes related to oxidative stress and seed coat by genome-wide association studies and reverse genetics. *Plant, Cell & Environment*. 2020;43:2523-2539. DOI: 10.1111/pce.13822
Safina G.F., Filipenko G.I. Longevity of seeds at storage and its predicting by the accelerated ageing method. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2013;174:124-131. [in Russian] (Сафина Г.Ф., Филипенко Г.И. Долговечность семян при хранении и ее прогнозирование методом ускоренного старения. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2013;174:124-131).
Silaeva O.I. Storage of seeds collections of the world's plant resources in conditions low positive temperatures – assessment, status, prospects. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2012;169:230-239. [in Russian] (Силаева О.И. Хранение коллекции семян мировых растительных ресурсов в условиях низких положительных температур – оценка, состояние, перспективы. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2012;169:230-239).
Solberg S.O., Yndgaard F., Andreasen Ch., von Bothmer R., Loskutov I.G., Asdal A. Long-term storage and longevity of orthodox seeds: a systematic review. *Frontiers in Plant Science*. 2020;11:1007. DOI: 10.3389/fpls.2020.01007
Stepanov V.N. Biological classification of agricultural plants of field culture. *Izvestiya of Timiryazev Agricultural Academy*. 1957;(2):5-29. [in Russian] (Степанов В.Н. Биологическая классификация сельскохозяйственных растений полевой культуры. *Известия Тимирязевской сельскохозяйственной академии*. 1957;(2):5-29).
Storozheva N.N. Impact of long-term storage of crop seeds in permafrost soil strata on viability and phenotypic variability (Vliyaniye dlitel'nogo khraneniya semyan sel'skokhozyaystvennykh kul'tur v usloviyakh tolshchi mnogoletnemerzlykh gruntov na zhiznesposobnost' i fenotipicheskuyu izmenchivost) [dissertation]. Yakutsk; 2006. [in Russian] (Сторожева Н.Н. Влияние длительного хранения семян сельскохозяйственных культур в условиях толщи многолетнемерзлых грунтов на жизнеспособность и фенотипическую изменчивость: дис. … канд. с.-х. наук. Якутск; 2006).
Tekrony D.M., Egli D.B., Phillips A.D. Effect of field weathering on the viability and vigor of soybean seed. *Agronomy Journal*. 1980;72(5):749-753. DOI: 10.2134/agronj1980.00021962007200050014x
Teplykh A.A., Prokhorova E.V. The influence of spruce seeds longevity on their practical germinating ability. *Vestnik of Volga State University of Technology. Series «Forest. Ecology. Nature management»*. 2018;2(38):19-28. [in Russian] (Теплых А.А., Прохорова Е.В. Влияние сроков хранения семян ели на их техническую всхожесть. *Вестник Поволжского государственного технологического университета. Серия: лес. экология. Природопользование*. 2018;2(38):19-28). DOI: 10.15350/2306-2827.2018.2.19
Vavilov N.I. Botanical and geographical principles of breeding (The doctrine of source material in breeding) (Botaniko-geograficheskiye osnovy selektsii (Ucheniye ob iskhodnom materiale v selektsii)). In: *Academician N.I. Vavilov. Selected Works* (*Akademik N.I. Vavilov. Izbrannye trudy*). Moscow; Leningrad: Nauka; 1960. Vol. 2. p.21-70. [in Russian] (Вавилов Н.И. Ботанико-географические основы селекции (Учение об исходном материале в селекции). В кн.: *Академик Н.И. Вавилов. Избранные труды.* Москва; Ленинград: Наука;1960. Т. 2. С.21-70).
Yamasaki F., Domon E., Tomooka N., Baba-Kasai A., Nemoto H., Ebana K. Thirty-year monitoring and statistical analysis of 50 species' germinability in genebank medium-term storage suggest specific characteristics in seed longevity. *Seed Science and Technology*. 2020;48(2):269-287. DOI: 10.15258/sst.2020.48.2.14

Информация об авторах

Ирина Владимировна Сеферова, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, отдел генетических ресурсов зерновых бобовых культур, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, i.seferova@vir.nw.ru, https://orcid.org/0000-0003-3308-9198

Галина Ивановна Филипенко, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, исполняющая обязанности заведующего, лаборатория долгосрочного хранения генетических ресурсов, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, g.filipenko@vir.nw.ru, https://orcid.org/0000-0001-8419-1518

Ольга Николаевна Забегаева, старший научный сотрудник, лаборатория долгосрочного хранения генетических ресурсов, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, o.zabegaeva@vir.nw.ru, https://orcid.org/0000-0002-6316-3232

Александр Петрович Бойко, доктор сельскохозяйственных наук, директор филиала, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Адлерская опытная станция – филиал ВИР, 354340 Россия, Сочи, ул. Ленина, 95, aos.vir@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1510-8546

Александр Юрьевич Некрасов, старший научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), Кубанская опытная станция – филиал ВИР, 352183 Россия, Краснодарский край, Гулькевичский район, пос. Ботаника, ул. Центральная, 2, kos.vir.nekrasov@mail.ru, https://orcid.org/0000-0001-7332-1209

Любовь Юрьевна Новикова, доктор сельскохозяйственных наук, старший научный сотрудник, заведующая, отдел автоматизированных информационных систем генетических ресурсов растений, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, l.novikova@vir.nw.ru, https://orcid.org/0000-0003-4051-3671

Information about the authors

Irina V. Seferova, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Department of Grain Legume Crop Genetic Resources, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, i.seferova@vir.nw.ru, https://orcid.org/0000-0003-3308-9198

Galina I. Filipenko, Cand. Sci. (Agriculture), Leading Researcher, Acting Head, Laboratory of Long-Term Storage of Genetic Resources, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, g.filipenko@vir.nw.ru, https://orcid.org/0000-0001-8419-1518

Olga N. Zabegayeva, Senior Researcher, Laboratory of Long-Term Storage of Genetic Resources, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, o.zabegaeva@vir.nw.ru, https://orcid.org/ orcid.org/0000-0002-6316-3232

Alexander P. Boyko, Dr. Sci. (Agriculture), Director of the branch, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), Adler Experiment Station, a branch of VIR, Sochi, Krasnodar Territory, 354340, Russia, aos.vir@mail.ru, https://orcid.org/0000-0002-1510-8546

Alexander Yu. Nekrasov, Senior Researcher, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), Kuban Experiment Station, a branch of VIR, Botanika Settlement, Gulkevichsky District, Krasnodar Territory, 352183 Russia, kos.vir.nekrasov@mail.ru, https://orcid.org//0000-0001-7332-1209

Lyubov Yu. Novikova, Dr. Sci. (Agriculture), Senior Researcher, Head, Department of Automated Information Systems of Plant Genetic Resources, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, l.novikova@vir.nw.ru, https://orcid.org/0000-0003-4051-3671

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 02.08.2024; одобрена после рецензирования 29.08.2024; принята к публикации 19.09.2024.
The article was submitted on 02.08.2024; approved after reviewing on 29.08.2024; accepted for publication on 19.09.2024.

Краткое сообщение
УДК 57.088.1
DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o3

(cc) BY

Молекулярно-генетический инструментарий для анализа дифференциальной экспрессии генов субъединиц β-конглицининов сои

А. А. Катрушенко, П. Д. Тимкин, А. А. Пензин

Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт сои», Благовещенск, Амурская область, Россия

Автор, ответственный за переписку: Анастасия Андреевна Катрушенко, aak@vniisoi.ru

Большая часть белков в семенах сои являются запасными, среди которых β-конглицинины и глицинины, необходимы растению для прорастания семян. В то же время, они являются наиболее ценными соевыми белками, использующимися в пищевой промышленности, так как их субъединичный состав и доля от общего белка может влиять на качество получаемого пищевого продукта. β-конглицинины являются тримерами, состоящими из разного состава субъединиц, обозначаемых как α', α, β и кодируемых генами *CG-1*, *CG-3* и *CG-4* соответственно. Для ПЦР-анализа использовали модельный сорт сои 'Сентябринка'. В качестве матрицы использовали комплементарную ДНК, синтезированную на основе РНК, выделенной из семян исследуемого сорта. Применяли пары праймеров к транскриптам генов *CG-1*, *CG-3* и *CG-4*, созданные *in silico*. В результате ПЦР и анализа полученных электрофореграмм подобраны оптимальные температуры отжига праймеров для генов *CG-1*, *CG-3* и *CG-4*, при которых проявляется только характерный фрагмент. Таким образом, для комплексного изучения качественного и количественного состава соевого белка создан молекулярно-генетический инструментарий, с помощью которого можно осуществлять дальнейший анализ дифференциальной экспрессии генов, отвечающих за синтез субъединиц β-конглицининов сои.

***Ключевые слова*:** соевые белки, *CG-1, CG-3, CG-4,* количественная ПЦР в реальном времени

Благодарности: работа выполнена в рамках федерального проекта «Аграрная наука – шаг в будущее развития АПК» по теме № 082-3-2023-0007

Для цитирования: Катрушенко А.А., Тимкин П.Д., Пензин А.А. Молекулярно-генетический инструментарий для анализа дифференциальной экспрессии генов субъединиц β-конглицининов сои. *Биотехнология и селекция растений*. 2024;7(3):53-60. DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o3

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.

© Катрушенко А.А., Тимкин П.Д., Пензин А.А., 2024

Brief communication
DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o3

A molecular genetic toolkit for the differential expression analysis of soybean β-conglycinin subunit genes

Anastasia A. Katrushenko, Pavel D. Timkin, Andrey A. Penzin

Federal Research Center «All-Russian Research Institute of Soybean», Blagoveshchensk, Amur Region, Russia

Corresponding author: Anastasia A. Katrushenko, aak@vniisoi.ru

The majority of proteins in soybean seeds are storage ones, including β-conglycinin and glycinin, which are necessary for seed germination. At the same time, they are the most valuable soy proteins used in the food industry, since their subunit composition and proportion of total protein can affect the quality of the resulting food product. β-conglycinins are trimers with different composition of subunits which are designated as α', α, β and encoded by the *CG-1*, *CG-3*, and *CG-4* genes, respectively. The PCR analysis employed a model soybean cultivar 'Sentyabrinka'. A complementary DNA synthesized from the RNA isolated from seeds of the studied cultivar served as a template. The *in silico* created pairs of primers for *CG-1*, *CG-3*, and *CG-4* gene transcripts were used. As the result of PCR and the analysis of the obtained electrophoregrams, optimal annealing temperatures of primers for the *CG-1*, *CG-3* and *CG-4* genes were selected, at which only the characteristic fragment was observed. Thus, a molecular genetic toolkit has been developed for a comprehensive study of the qualitative and quantitative composition of soybean protein and can be used for further analysis of differential expression of genes responsible for the synthesis of β-conglycinin subunits.

Keywords: soybean proteins, *CG-1, CG-3, CG-4,* quantitative real-time PCR

Acknowledgements: The work was carried out within the framework of the Federal project "Agrarian science – a step into the future development of the agro-industrial complex" on topic No. 082-3-2023-0007

For citation: Katrushenko A.A., Timkin P.D., Penzin A.A. A molecular genetic toolkit for the differential expression analysis of soybean β-conglycinin subunit genes. *Plant Biotechnology and Breeding.* 2024;7(3):53-60. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o3

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.

© Katrushenko A.A., Timkin P.D., Penzin A.A., 2024

Введение

Соя (*Glycine max* (L.) Merr.) широко используется во всем мире в качестве продуктов питания человека, кормов для животных и сырья для промышленности (Van Den Berg et al., 2022). Это ценная зернобобовая культура с большим содержанием белка в семенах, которое составляет примерно 40%. Большая часть, около 70% запасных белков семян, приходится на β-конглицинин и глицинин с коэффициентами седиментации 7S и 11S соответственно. Они используются семенем для прорастания (Hooker et al., 2023). У этих белков различные физико-химические свойства, которые определяются структурными особенностями их молекул, что может быть использовано при приготовлении пищевых продуктов из сои (Fukushima, 2011). Они влияют на вкус, текстуру, термостойкость и другие свойства таких продуктов как тофу, соевое мясо, фаршевые изделия, десерты, соусы и т. д. (Tang, 2019, Qin et al., 2022). Однако соевые семена содержат и вещества, не обладающие питательными свойствами, и даже препятствующие усвоению питательных веществ, например, ингибиторы протеаз и агглютинины. Кроме того, белки сои могут вызывать аллергию как у людей, так и у животных (Zhao et al., 2021, Siddique et al., 2024). В последнее время возрос интерес к изучению β-конглицинина из-за его аллергенности и в то же время возможной пользы для здоровья, что обуславливает интерес исследователей к этому белку и разработку пищевых продуктов и ингредиентов на его основе (Wang et al., 2014, Wiederstein et al., 2023).

β-конглицинин представляет собой гликопротеин с молекулярной массой около 180 кДа. Он состоит из трех субъединиц α', α и β с молекулярными массами 71, 67 и 50 кДа соответственно, характеризующихся сходными аминокислотными последовательностями. Субъединицы комбинируются случайным образом, образуя три гомотримера и семь гетеротримеров (Sui et al., 2021). В других работах не было обнаружено сведений о субъединичном составе у разных сортов. Запасные белки синтезируются в семенах на более поздних стадиях развития. Гены β-конглицинина на ранних стадиях показывают низкие уровни экспрессии; ее максимальные значения наблюдаются при массе семядоли 100-200 мг (Jones, Vodkin, 2013; Peng et al., 2021). В таблице 1 показаны цифровые подсчеты экспрессии генов субъединиц β-конглицинина в семенах на 14-й, 21-й, 25-й, 28-й, 35-й и 42-й дни после цветения (согласно международной базе данных SoyBase, 2024).

Между различными генотипами существуют явные различия в количественном соотношении разных фракций запасных белков. Меньшее количество глицинина сопровождается накоплением β-конглицинина, так что сумма этих запасных белков остается одинаковой независимо от общего содержания белка (Yang et al., 2016).

Таблица 1. Экспрессия генов β-конглицинина в семенах сои[1]

Table 1. Expression of β-conglycinin genes in soybean seeds

Ген	14-й	21-й	25-й	28-й	35-й	42-й
Glyma10g39150 (*CG-1*)	9	217	47663	63048	199447	146831
Glyma20g28460 (*CG-4*)	0	0	4	8	342	1671
Glyma20g28650 (*CG-3*)	0	0	32	69	180	256

[1] Данные выражены в числе копий транскриптов по результатам РНК-секвенирования на 14-й, 21-й, 25-й, 28-й, 35-й и 42-й дни после цветения (SoyBase, 2024)

Определено пятнадцать генов субъединиц β-конглицинина, обозначенных *CG-1* – *CG-15*, большинство из которых недостаточно изучены. Продукты генов *CG-5* – *CG-15* неизвестны, поэтому их можно считать потенциальными псевдогенами. Ген *CG-1* кодирует α'-субъединицу, *CG-4* кодирует β-субъединицу, а гены *CG-2* и *CG-3* кодируют α-субъединицу, гомологичны, а продукты генов идентичны по составу аминокислот (Zhang et al., 2021, Yoshino et al., 2002). Эти гены являются функционально активными. Каждый из них состоит из шести экзонов, разделенных пятью интронами, подобно генам, кодирующим белки типа 7S глобулина других бобовых (Yoshino et al., 2001). Ген *CG-2* показывает низкую экспрессию по сравнению с *CG-3* (Yoshino et al., 2002). *CG-1* располагается на хромосоме 10, а *CG-3* и *CG-4* – на хромосоме 20. Для косвенного определения субъединиц β-конглицинина перспективна оценка количества транскриптов интересуемых генов, что может быть использовано в селекции при создании сортов с заданным составом субъединиц этого белка. Такой подход использован при изучении запасных белков других растений, например пшеницы (Noma et al., 2016) и ячменя (Kaczmarczyk et al., 2012). Данных об использовании этого подхода для определения субъединиц β-конглицинина сои в литературе обнаружить не удалось.

Для изучения дифференциальной экспрессии любых генов, в том числе генов β-конглицининов, используют разные методы, такие как РНК-секвенирование, технология микрочипов (Jones, Vodkin, 2013), норзерн-блоттинг, количественная полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Оценить уровень экспрессии генов *CG-1*, *CG-3* и *CG-4* в разных сортах сои можно с использованием метода

количественной ПЦР в реальном времени (Adams, 2020). ПЦР-анализ как метод молекулярной биологии широко используется в разных отраслях. Данный метод позволяет многократно увеличить количество заданных фрагментов ДНК с известной последовательностью в анализируемом образце. Для того, чтобы амплифицировать целевой участок ДНК, нужно правильно подобрать ограничивающие его праймеры, комплементарные противоположным концам цепей нужного фрагмента ДНК-мишени. Правильно разработанные праймеры играют ключевую роль в образовании и накоплении продуктов амплификации. Они должны отвечать ряду критериев. Размер праймеров должен быть, как правило, от 15 до 30 нуклеотидов, они должны быть специфичными для интересующего участка матрицы (Rodríguez et al., 2015). При недостаточной специфичности праймеров в процессе ПЦР будут образовываться нецелевые продукты амплификации. Праймеры не должны образовывать вторичные структуры – димеры и шпильки. Структура праймеров определяет оптимальную температуру отжига, связывания с матрицей, варьирующую от 40°C до 65°C (Degen et al., 2006), при этом достигается высокая специфичность ПЦР. При слишком высокой температуре праймеры плохо связываются с матрицей и образуется очень небольшое количество амплифицированной ДНК. Если температура отжига слишком низкая, может происходить неспецифический отжиг праймеров, приводящий к амплификации нежелательных фрагментов ДНК (Green, Sambrook, 2019).

Концентрация праймеров также влияет на эффективность и специфичность связывания с матрицей и обычно составляют от 0,1 до 0,5 мкМ. Если образуется слишком мало продукта амплификации, можно увеличить концентрацию праймеров, но при этом может снизиться специфичность (Green, Sambrook, 2019).

Несмотря на то, что оптимальная температура отжига определяется программой для разработки праймеров, от теоретически рассчитанной экспериментальная температуры отжига может сильно отличаться. Таким образом, может потребоваться оптимизация (Rodríguez et al., 2015). Вышесказанное справедливо и для подбора условий для амплификации генов *CG-1*, *CG-3* и *CG-4* и, прежде всего, температуры отжига праймеров, специфичных для этих генов, при которой не будет происходить накопление неспецифических продуктов ПЦР.

Материалы и методы

Для исследования использовали сорт сои селекции Федерального научного центра «Всероссийский научно-исследовательский институт сои» (ВНИИ сои) ‘Сентябринка’, так как это один из распространенных и наиболее продаваемых сортов. Семена измельчали до порошка, 0,05 г которого помещали в каждую из четырех пробирок. Из этого порошка выделяли РНК с помощью набора HiPure Plant RNA Mini Kit (Magen Biotechnology, Китай) для выделения РНК из растений на колонках с силикагелевой мембраной, согласно прилагаемой инструкции производителя. Каждый из четырех образцов РНК амплифицировали в 2-кратной повторности. Анализ проводили путем внесения РНК исследуемых образцов индивидуально в микропробирки по 0,2 мкл для ПЦР-диагностики в режиме реального времени. На основе этой выделенной РНК синтезировали комплементарную ДНК (кДНК) путём обратной транскрипции методом ПЦР с использованием набора реактивов ОТ M-MuLV–RH (Биолабмикс, Россия). Смесь для этой биохимической реакции состояла из матрицы РНК, олиго$(dT)_{16}$ праймера и воды, обработанной диэтилпирокарбонатом (ДЭПК). Эту смесь прогревали 2-3 мин при 70°C для денатурации вторичных структур и помещали пробирку в лёд. Далее к ней добавляли предварительно приготовленную смесь следующего состава: 4 мкл 5×реакционного буфера, 2 мкл 0,1 М дитиотреитола (ДТТ), 1 мкл 10 мМ смеси высокоочищенных дезоксирибонуклеотидов в водном растворе (dNTP), 1 мкл M-MuLV–RH ревертазы (100 ед./мкл). Инкубировали реакционную смесь 30 мин при 42°C для синтеза кДНК, которую далее использовали в качестве матрицы для ПЦР. Применяли пары праймеров для транскриптов генов *CG-1*, *CG-3* и *CG-4*, созданные *in silico* (Penzin, Timkin, 2023), последовательности которых приведены в таблице 2.

Таблица 2. Последовательности праймеров к транскриптам рассматриваемых генов

Table 2. Primer sequences for transcripts of the studied genes

Название гена	Последовательность прямого праймера (5'→ 3')	Последовательность обратного праймера (5'→ 3')
CG-1	GCTGGGAGTTGTTTTCCTGGCA	TTGGTGTGGGCGTGGGTGTT
CG-3	TGCTGGGACTTGTTTTCCTGGCT	ACTCCCTCTTGCTGCCTCTGCT
CG-4	ACTCCTACAACCTTCACCCTGGCG	ACTCCCTCTTGCTGCCTCTGCT

ПЦР осуществляли с помощью амплификатора CFX96 (Real-time) (Bio-Rad Laboratories Inc., США) в объеме реакционной смеси 25 мкл, включавшей: 12,5 мкл готовой реакционной смеси БиоМастер HS-Taq ПЦР-Color (2×) (Биолабмикс, Россия); 1 мкл кДНК; по 1,25 мкл прямого и обратного праймеров; 9 мкл стерильной воды.

Амплификацию проводили при следующих температурных режимах: начальная денатурация – при 95°C в течение 5 мин, затем 30 циклов при температурно-временном режиме: [денатурация при 95°C – 10 с, градиентный отжиг праймера – 30 с, элонгация – при 72°C в течение 50 с]; финальная элонгация – при 72°C в течение 12 мин. Полученные ампликоны объемом 5 мкл наносили на 2% агарозный гель с добавлением бромистого этидия для электрофореза, на отдельную дорожку наносили маркер длин фрагментов ДНК 100+ bp DNA Ladder (Евроген, Россия) с шагом 100 пн. Электрофорез проводили в камере для горизонтального электрофореза SE-1 (Хеликон, Россия) в 0,5×TBE при напряжении 90–100 В и силе тока 50 мА в течение 1,5–2 ч. Для получения электрофореграмм подложка помещалась в гель-документирующую систему GelDoc EZ (Bio-Rad Laboratories Inc., США).

Чтобы проверить эффективность праймеров, проводили ПЦР с образцами других 15 сортов сои: ‘Алпетра’, ‘Евгения’, ‘Золушка’, ‘Лучистая’, ‘Статная’, ‘Грэй’, ‘Пепелина’, ‘Умка’, ‘Топаз’, ‘Золотница’, ‘Апис’, ‘ВНИИС 18’, ‘Лидия’, ‘Персона’, ‘Невеста’. Также в качестве отрицательного контроля на агарозный гель наносили смесь, не содержащую кДНК.

Результаты и обсуждение

После приготовления смеси для амплификации проводили ПЦР-анализ при разных температурах отжига праймеров от 40°C до 65°C с кратностью интервала 1°C. Оптимальной считалась температура отжига, при которой наблюдались только хорошо различимые амплифицированные фрагменты в областях 430 пн, 286 пн и 595 пн и не было нецелевых фрагментов.

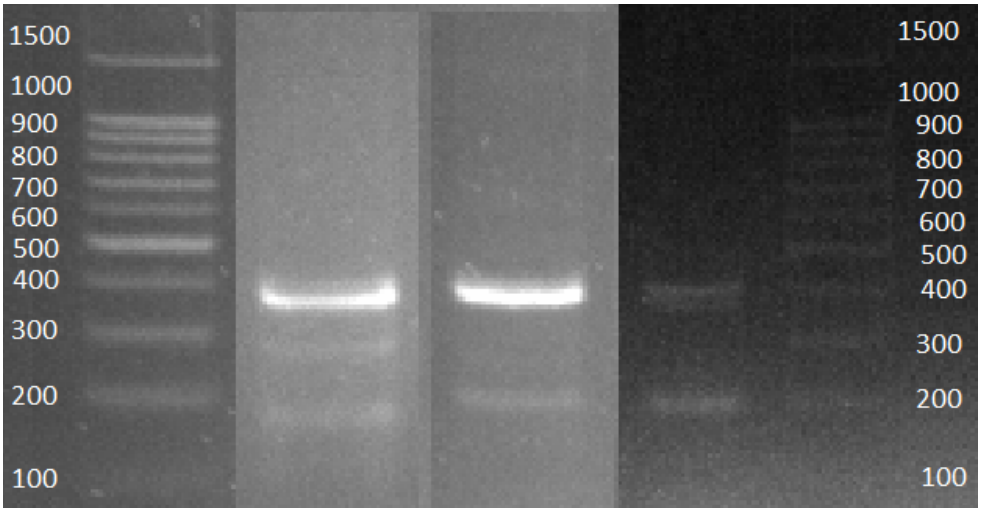


Рис. 1. Электрофоретический спектр ампликонов, полученных с праймерами к *CG-3* при температурах отжига 40°C, 45°C и 50°C
M – маркер размера фрагментов ДНК (100+пн)

Fig. 1. Electrophoretic spectrum of amplicons obtained with *CG-3* primers at annealing temperatures of 40°C, 45°C and 50°C
M – DNA fragment size marker – 100+bp DNA Ladder

Из рисунка 1 видно, что при 40°C, 45°C и 50°C помимо яркой специфической полосы в области 430 пн, наблюдаются также и дополнительные неспецифические фрагменты, что указывает на то, что температура отжига слишком низкая. Поэтому ее повышали до получения только одного четкого и ярко выраженного фрагмента в нужной области.

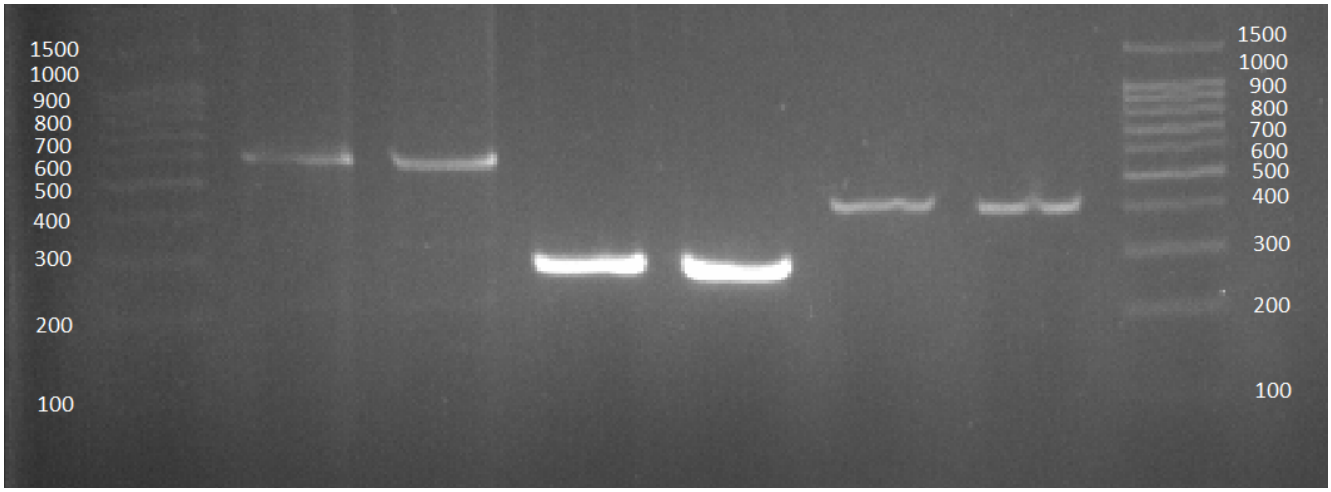


Рис. 2. Электрофоретический спектр продуктов амплификации кДНК сои
M – маркер размера фрагментов ДНК (100+пн), *CG-1* – при 50°C, *CG-4* и *CG-3* – при 65°C

Fig. 2. Electrophoretic spectrum of soy cDNA amplification products
M – DNA fragment size marker – 100+bp DNA Ladder, *CG-1* – at 50°C, *CG-4* and *CG-3* – at 65°C

При повышении температуры отжига до 65°C для праймеров, специфичных для генов *CG-3* и *CG-4*, и до 50°C для *CG-1*, эти дополнительные фракции исчезали и оставались только характерные фрагменты, что показано на рисунке 2. Длины амплифицированных фрагментов соответствуют ожидаемым для локусов *CG-3*, *CG-4* и *CG-1* (430 пн, 286 пн и 595 пн, соответственно). Таким образом, подобранные экспериментальным путем температуры отжига можно использовать как оптимальные.

Пример электрофореграммы продуктов амплификации, полученных с праймерами к *CG-4* других сортов для проверки эффективности праймеров, показан на рисунке 3. Видны четкие полосы длиной 286 пн.

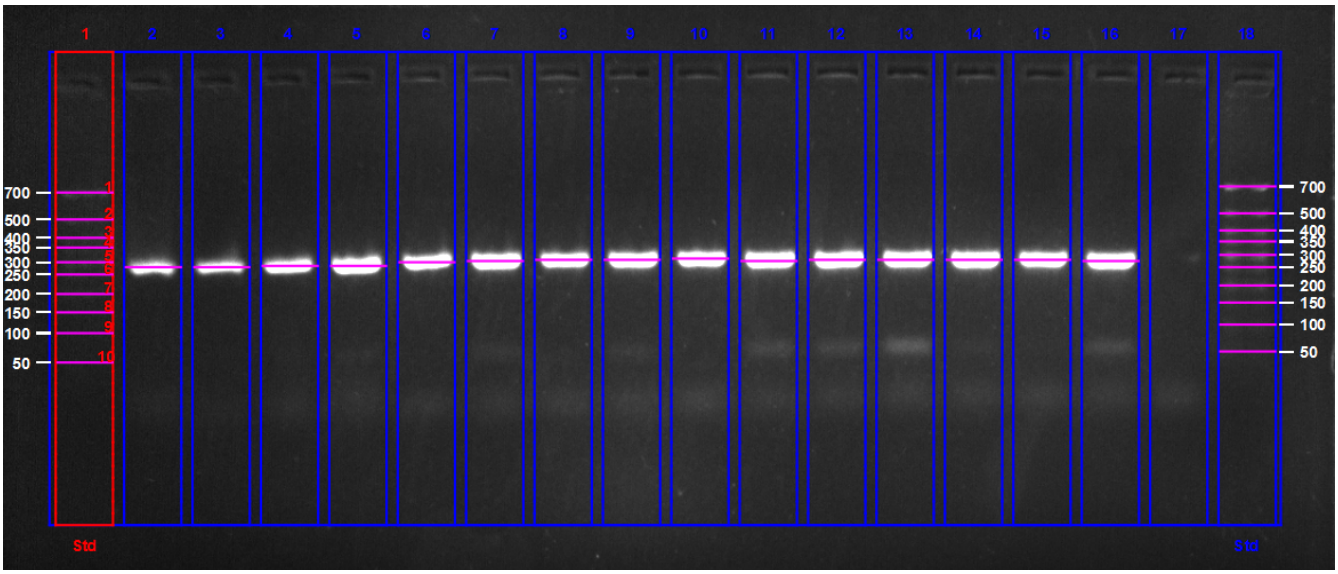


Рис. 3. Электрофоретический спектр продуктов ПЦР по матрице кДНК различных сортов сои (для *CG-4*)
1 и 18 – маркер размера фрагментов ДНК (50+пн); 2-16 исследуемые сорта (список представлен в разделе Материалы и методы), 17 – отрицательный контроль

Fig. 3. Electrophoretic spectrum of PCR products of cDNA of different soybean cultivars (for *CG-4*)
1 and 18 – DNA fragment size marker – 50+ bp DNA Ladder; 2-16 studied cultivars, 17 – negative control

Заключение

В результате проделанной работы найдены оптимальные температуры отжига праймеров для генов β-конглицининов, при которых проявляются только фрагменты размером 430 пн, 286 пн и 595 пн. Температуры отжига пар праймеров для *CG-3* и *CG-4* составили 65°C, для *CG-1* – 50°C. При использовании данных температур в процессе постановки амплификации отжиг праймеров происходит в целевых районах кДНК. Это было отчетливо видно на электрофореграммах, где все ампликоны имели ожидаемый размер.

Таким образом для комплексного изучения качественного и количественного состава соевого белка создан молекулярно-генетический инструментарий позволяющий проводить дальнейший анализ дифференциальной экспрессии генов, отвечающих за синтез субъединиц β-конглицининов, с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Анализ экспрессии подобных генов позволит типировать различные сорта сои, что в перспективе может служить новым направлением в селекционно-семеноводческом процессе, где будет оцениваться качественный состав белка, а не только его количество.

References/Литература

Adams G. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. *The Biochemist*. 2020;42(3):48-53. DOI: 10.1042/BIO20200034

Degen H.-J., Deufel A., Eisel D., Grünewald-Janho S., Keesey J. (eds). PCR applications manual. Roche Molecular Biochemicals. 3rd ed. Mannheim, Germany: Roche Applied Science; 2006.

Fukushima D. Soy proteins. In: G.O. Phillips, P.A. Williams (eds). *Handbook of Food Proteins*. Woodhead Publishing Limited; 2011. p.210-232. DOI: 10.1533/9780857093639.210

Green M.R, Sambrook J. Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*. 2019;6:436-456. DOI: 10.1101/pdb.top095109

Hooker J.C., Nissan N., Luckert D., Charette M., Zapata G., Lefebvre F., Mohr R.M., Daba K.A., Warkentin T.D., Hadinezhad M., Barlow B., Hou A., Golshani A., Cober E.R., Samanfar B. A multi-year, multi-cultivar approach to differential expression analysis of high- and low-protein soybean (*Glycine max*). *International journal of molecular sciences*. 2023;24(1):222. DOI: 10.3390/ijms24010222

Jones S.I., Vodkin L.O. Using RNA-Seq to profile soybean seed development from fertilization to maturity. *PLoS One.* 2013;8(3):e59270. DOI: 10.1371/journal.pone.0059270

Kaczmarczyk A., Bowra S., Elek Z., Vincze E. Quantitative RT-PCR based platform for rapid quantification of the transcripts of highly homologous multigene families and their members during grain development. *BMC Plant Biology.* 2012;12:184. DOI: 10.1186/1471-2229-12-184

Noma S., Kawaura K., Hayakawa K., Abe C., Tsuge N., Ogihara Y. Comprehensive molecular characterization of the α/β-gliadin multigene family in hexaploid wheat. *Molecular Genetics and Genomics.* 2016;291(1):65-77. DOI: 10.1007/s00438-015-1086-7

Peng L., Qian L., Wang M., Liu W., Song X., Cheng H., Yuan F., Zhao M. Comparative transcriptome analysis during seeds development between two soybean cultivars. *PeerJ.* 2021;9:e10772. DOI: 10.7717/peerj.10772

Penzin A.A., Timkin P.D. In silico design of primers for profiling spare soy proteins. *Journal of Bioinformatics and Genomics.* 2023;3(21):1-5. DOI: 10.18454/jbg.2023.21.4

Qin P., Wang T., Luo Y. A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. *Journal of Agriculture and Food Research*. 2022;7(12):100265. DOI: 10.1016/j.jafr.2021.100265

Rodríguez A., Rodríguez M., Córdoba J.J., Andrade M.J. Design of primers and probes for quantitative real-time PCR methods. In: *Methods in Molecular Biology*. 2015. Vol. 1275. p.31-56. DOI: 10.1007/978-1-4939-2365-6_3

Siddique S., Mustafa S.E., Saggo A.A., Amam M. Physiological and nutraceutical properties of soybean (*Glycine max* L.). In: J.C. Jimenez-Lopez, J. Escudero-Feliu. *Soybean Crop – Physiological, Genetic and Nutraceutical Aspects.* 2024. DOI: 10.5772/intechopen.113864

SoyBase. Integrating Genetics and Genomics to Advance Soybean Research Available from: https://soybase.org/ [accessed Jun. 24, 2024]

Sui X., Zhang T., Jiang L. Soy protein: molecular structure revisited and recent advances in processing technologies. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2021;12(1):119-147. DOI: 10.1146/annurev-food-062220-104405

Tang C. Nanostructures of soy proteins for encapsulation of food bioactive ingredients. In: S.M. Jafari (ed.). *Biopolymer Nanostructures for Food Encapsulation Purposes*. Academic Press; 2019. Vol. 1. p.247-285. DOI: 10.1016/b978-0-12-815663-6.00010-0

Van Den Berg L.A., Mes J.J., Mensink M., Wanders A.J. Protein quality of soy and the effect of processing: a quantitative review. *Frontiers in Nutrition. Sec. Nutrition and Food Science Technology.* 2022;9. DOI: 10.3389/fnut.2022.1004754

Wang T. Qin G.-X., Sun Z.-W., Zhao Y. Advances of research on glycinin and β-conglycinin: A review of two major soybean allergenic proteins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2014;54(7):850-862. DOI: 10.1080/10408398.2011.613534

Wiederstein M., Baumgartner S., Lauter K. Soybean (*Glycine max*) allergens – a review on an outstanding plant food with allergenic potential. *The American Chemical Society Food Science & Technology.* 2023;3(3):363-378. DOI: 10.1021/acsfoodscitech.2c00380

Yang A., Yu X., Zheng A., James A.T. Rebalance between 7S and 11S globulins in soybean seeds of differing protein content and 11SA4. *Food Chemistry*. 2016:210:148-155. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.04.095

Yoshino M., Kanazawa A., Tsutsumi K., Nakamura I., Shimamoto Y. Structure and characterization of the gene encoding α subunit of soybean β-conglycinin. *Genes & Genetic Systems.* 2001;2(76):99-105. DOI: 10.1266/ggs.76.99

Yoshino M, Kanazawa A, Tsutsumi K, Nakamura I, Takahashi K, Shimamoto Y. Structural variation around the gene encoding the α subunit of soybean β-conglycinin and correlation with the expression of the α subunit. *Breeding Science*. 2002;52:285-292. DOI: 10.1270/jsbbs.52.285

Zhang S., Du H., Ma Y., Li H., Kan G., Yu D. Linkage and association study discovered loci and candidate genes for glycinin and β-conglycinin in soybean (*Glycine max* L. Merr.). *Theoretical and Applied Genetics.* 2021;134(4):1201-1215. DOI: 10.1007/s00122-021-03766-6

Zhao Y., Naren G., Qiang J., Qin G., Bao N., Farouk M.H. Identification of allergic epitopes of soybean β-conglycinin in different animal species. *Frontiers in veterinary science.* 2021;7:599546. DOI: 10.3389/fvets.2020.599546

Информация об авторах

Анастасия Андреевна Катрушенко, лаборант-исследователь, лаборатория биотехнологии, Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт сои», Россия 675000, Амурская область, Благовещенск, Игнатьевское шоссе, 19, aak@vniisoi.ru, https://orcid.org/0009-0008-3104-1696
Павел Дмитриевич Тимкин, младший научный сотрудник, лаборатория биотехнологии, Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт сои», Россия 675000, Амурская область, Благовещенск, Игнатьевское шоссе, 19, tpd@vniisoi.ru, https://orcid.org/0000-0001-6655-1049
Андрей Андреевич Пензин, научный сотрудник, лаборатория биотехнологии, Федеральный научный центр «Всероссийский научно-исследовательский институт сои», Россия 675000, Амурская область, Благовещенск, Игнатьевское шоссе, 19, paa@vniisoi.ru, https://orcid.org/0000-0002-8578-9818

Information about the authors

Anastasia A. Katrushenko, Research Assistant, Laboratory of Biotechnology, Federal Scientific Center «All-Russian Research Institute of Soybean», 19, Ignat'evskoe Highway, Blagoveshchensk, Amur Region, 675000 Russia, aak@vniisoi.ru, https://orcid.org/0009-0008-3104-1696
Pavel D. Timkin, Junior Researcher, Laboratory of Biotechnology, Federal Scientific Center «All-Russian Research Institute of Soybean», 19, Ignat'evskoe Highway, Blagoveshchensk, Amur Region, 675000 Russia, tpd@vniisoi.ru, https://orcid.org/0000-0001-6655-1049
Andrey A. Penzin, Researcher, Laboratory of Biotechnology, Federal Scientific Center «All-Russian Research Institute of Soybean», 19, Ignat'evskoe Highway, Blagoveshchensk, Amur Region, 675000 Russia, paa@vniisoi.ru, https://orcid.org/0000-0002-8578-9818

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 22.04.2024; одобрена после рецензирования 07.08.2024; принята к публикации 13.09.2024.
The article was submitted on 22.04.2024; approved after reviewing on 07.08.2024; accepted for publication on 13.09.2024.

Краткое сообщение
УДК 631.52:633.1(476)(092)
DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o4

(cc) BY

К юбилею академика НАН Беларуси Станислава Ивановича Гриба

Л. В. Хотылева[1], Е. К. Хлесткина[2], И. С. Матыс[3]

[1]Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

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

[3]Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию, Жодино, Беларусь

Автор, ответственный за переписку: Ирина Станиславовна Матыс, belgenbank@izis.by

Станиславу Ивановичу Грибу, доктору сельскохозяйственных наук, профессору, заслуженному деятелю науки Республики Беларусь, лауреату Государственной премии Республики Беларусь, академику Национальной академии наук (НАН) Беларуси, иностранному члену Российской академии наук и Национальной академии аграрных наук Украины, талантливому ученому Беларуси в области селекции растений, известному в стране и за ее пределами, лидеру белорусской научной школы в области селекции и семеноводства, опытному организатору аграрной науки 6 августа 2024 года исполнилось 80 лет. Им впервые в Беларуси научно обосновано и реализовано на практике новое научное направление – селекция интенсивных сортов зерновых культур с урожайностью 10-12 т/га зерна; разработаны методы создания генетического разнообразия и идентификации генотипов, сочетающих в себе высокую продуктивность и хорошее качество продукции с толерантностью к биотическим и абиотическим факторам среды; обоснованы параметры модели интенсивных сортов; созданы и внедрены в производство системы высокопродуктивных, ресурсосберегающих сортов ячменя, тритикале, яровой пшеницы. Результаты его научных исследований опубликованы более чем в 700 научных работах, в том числе 12 монографиях, книгах и учебниках. Станислав Иванович автор восьми изобретений и 89 сортов сельскохозяйственных растений. Академик С.И. Гриб – руководитель научной школы в Беларуси по селекции растений – подготовил четырех докторов и двенадцать кандидатов наук. Заслуги С.И. Гриба признаны за рубежом. Он избран иностранным членом Российской академии наук и Национальной академии аграрных наук Украины, почетным профессором Сибирского отделения РАН, членом Европейской ассоциации селекционеров (EUCARPIA), а также почетным доктором Белорусской сельскохозяйственной академии (БГСХА). Станислав Иванович награжден орденом «Знак Почета», грамотой Верховного Совета БССР, медалями и дипломами ВДНХ, почетными грамотами НАН Беларуси, Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь и РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию».

***Ключевые слова*:** селекция растений, генетические ресурсы растений, сорта, пшеница, тритикале, ячмень

Для цитирования: Хотылева Л.В., Хлесткина Е.К., Матыс И.С. К юбилею академика НАН Беларуси Станислава Ивановича Гриба. *Биотехнология и селекция растений*. 2024;7(3):61-68. DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o4

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.

© Хотылева Л.В., Хлесткина Е.К., Матыс И.С., 2024

Brief communication
DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o4

On the Anniversary of the Academician of the National Academy of Sciences of Belarus Stanislav Ivanovich Grib

Lyubov V. Khotyleva[1], Elena K. Khlestkina[2], Irina S. Matys[3]

[1] Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Republic of Belarus
[2] N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources, St. Petersburg, Russia
[3] Research and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Arable Farming, Zhodino, Republic of Belarus

Corresponding author: Irina S. Matys, belgenbank@izis.by

Stanislav Ivanovich Grib, Doctor of Agricultural Sciences, Professor, an Honored Scientist of the Republic of Belarus, a Laureate of the State Prize of the Republic of Belarus, an Academician of the National Academy of Sciences (NAS) of Belarus, a Foreign Member of the Russian Academy of Sciences and the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, a talented Belarusian scientist in the field of plant breeding, known in the country and abroad, the leader of the Belarusian scientific school in the area of breeding and seed production, an experienced organizer of agricultural science, turned 80 years old on August 6, 2024. He was the first in Belarus to scientifically substantiate and implement in practice a new scientific direction, that is, breeding of intensive varieties of grain crops with a yield of 10-12 t/ha of grain; developed methods for broadening genetic diversity and identifying genotypes that combine high productivity and good product quality with tolerance to biotic and abiotic environmental factors; substantiated the parameters of the model of intensive varieties; created and introduced into production systems of highly productive, resource-saving varieties of barley, triticale, and spring wheat. The results of his research have been published in more than 700 scientific works, including 12 monographs, books and textbooks. Stanislav Ivanovich is the author of eight inventions and 89 varieties of agricultural plants. Academician S.I. Grib, the leader of the scientific school of plant breeding in Belarus, trained four doctors and twelve candidates of science. S.I. Grib's achievements have been recognized abroad. He was elected a foreign member of the Russian Academy of Sciences and the National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, an Honorary Professor of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, a member of the European Association of Plant Breeders (EUCARPIA), and an Honorary Doctor of the Belarusian Agricultural Academy (BSAA). Stanislav Ivanovich was awarded the Order of the Badge of Honor, a diploma of the Supreme Council of the BSSR, medals and diplomas of the Exhibition of Economic Achievements, honorary diplomas of the National Academy of Sciences of Belarus, the Ministry of Agriculture and Food of the Republic of Belarus, and the Scientific and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Agriculture.

Keywords: plant breeding, plant genetic resources, cultivars, wheat, triticale, barley

For citation: Khotyleva L.V., Khlestkina E.K., Matys I.S. On the Anniversary of the Academician of the National Academy of Sciences of Belarus Stanislav Ivanovich Grib. *Plant Biotechnology and Breeding.* 2024;7(3):61-68. (In Russ.). DOI: 10.30901/2658-6266-2024-3-o4

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.

© Khotyleva L.V., Khlestkina E.K., Matys I.S., 2024

Академик Станислав Иванович Гриб – известный в стране и за рубежом ученый-селекционер, лидер белорусской научной школы в области селекции и семеноводства, опытный организатор аграрной науки. После окончания учебы в Белорусской сельскохозяйственной академии вся дальнейшая деятельность С.И. Гриба связана с селекцией, семеноводством, растениеводством и организацией аграрной науки в Республике Беларусь. С первых дней научной деятельности Станислав Иванович проявил себя талантливым ученым, умело сочетающим теоретические исследования и практическую селекцию. С 1970 по 1973 год работал заведующим отделом селекции и семеноводства Ганусовской опытно-селекционной станции по сахарной свекле. В 1973 году он назначается на должность заместителя руководителя Западного селекционного центра ВАСХНИЛ по зерновым, зернобобовым и крупяным культурам, а в 1978 году – заместителем директора по науке Белорусского НИИ земледелия и руководителем Западного селекционного центра. По совместительству с 1980 по 1990 год Станислав Иванович Гриб возглавлял отдел селекции и семеноводства яровых зерновых культур; с 1990 по 2001 год – лабораторию тритикале. В 1995–1997 годах он – вице-президент Академии аграрных наук Республики Беларусь; с 1997 по 2002 год – академик-секретарь Отделения земледелия и растениеводства Академии аграрных наук Республики Беларусь (ААН РБ).

С 2002 года С.И. Гриб – главный научный сотрудник лаборатории тритикале, с 2023 года – отдела зерновых колосовых культур РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию». Им впервые в Беларуси научно обосновано и реализовано на практике новое научное направление – селекция интенсивных сортов зерновых культур с урожайностью 10–12 т/га зерна; разработаны методы создания генетического разнообразия и идентификации генотипов, сочетающих высокую продуктивность и хорошее качество продукции с толерантностью к биотическим и абиотическим факторам среды; обоснованы параметры модели интенсивных сортов; созданы и внедрены в производство системы высокопродуктивных, ресурсосберегающих сортов ячменя, тритикале, яровой пшеницы (Bulavyna et al., 2019).

Талант селекционера Станислава Ивановича Гриба особенно ярко проявился в области выведения сортов ячменя, тритикале, яровой пшеницы. Начало работе по селекции ячменя было положено в 1973 году при фактическом отсутствии в призводстве белорусских сортов. К 1990 году под руководством С.И. Гриба уже было создано и районировано 12 сортов, которые вытеснили западноевропейские сорта, достигнув в структуре посевов 70% в Беларуси, и получили широкое распространение в России, Украине, Литве, Латвии.

Итогом его работы по селекции ячменя стала защита докторской диссертации на тему «Селекция интенсивных сортов ячменя в Белорусской ССР» (Grib, 1988) и звание лауреата Государственной премии Республики Беларусь в области науки и техники (1994).

Несомненны и весомы успехи С.И. Гриба в селекции новой зерновой культуры – тритикале, для работы с которой он организовал лабораторию, которую и возглавил в 1990 году, начав с создания первого в республике сорта ‘Дар Белоруссии’ (1987). К настоящему времени под его руководством и авторством выведено 47 новых сортов этой культуры, посевные площади которой превысили полмиллиона гектаров в Беларуси, а сорта ‘Михась’, ‘Идея’, ‘Кристалл’, ‘Свислочь’, ‘Динамо’, ‘Ульяна’, ‘Лотос’, ‘Норманн’, ‘Добро’, ‘Заозерье’, ‘Слово’, ‘Сельцо’ районированы и в России (Dolmatovich et al., 2015; Dubovets et al., 2013; Gordei et al., 2010; Grib, 2014; Grib, Kulinkovich, 2004; Grib et al., 2014; 2019; 2021; Yermishina et al., 2011; Zaitseva et al., 2012).

Хорошо зная проблему самообеспечения страны зерном пшеницы, Станислав Иванович в 1993 году заново, после 10-летнего перерыва, открывает селекцию яровой пшеницы. За короткое время им создано 24 новых сорта, среди которых ‘Дарья’, ‘Рассвет’, ‘Тома’, ‘Любава’, ‘Славянка’ и ‘Сударыня’ отнесены в группу ценных по качеству, при этом сорта ‘Дарья’ и ‘Сударыня’ получили широкое распространение в России, а ‘Рассвет’ – в Украине (Buloichik et al., 2013; Grib et al., 2016; Grib, Koptik, 2009; Kartel et al., 2010; Lemesh et al., 2023).

Результаты научных исследований С.И. Гриба опубликованы более чем в 700 работах, в том числе 12 монографиях, книгах и учебниках.

Станислав Иванович – автор восьми изобретений и 89 районированных сортов сельскохозяйственных культур, в том числе: сахарной свеклы – 2, ячменя – 12, овса – 4, яровой пшеницы – 24, тритикале – 47. Двадцать три из этих сортов включены в Госреестры зарубежных стран.

Лучшими достижениями отечественной селекции являются созданные им и под его научным руководством сорта ярового ячменя – ‘Зазерский 85’ – рекордная урожайность в СССР в 1987 году на экспериментальной базе «Устье» Оршанского района Витебской области на площади 100 га составила 101,4 ц/га, ‘Гонар’, ‘Прима Беларуси’, ‘Визит’ и другие; овса – ‘Буг’, ‘Белорусский голозерный’; озимого тритикале – ‘Михась’, ‘Дубрава’, ‘Кастусь’, ‘Прометей’, ‘Динамо’, ‘Благо 16’, ‘Гродно’; ярового тритикале – ‘Лана’, ‘Узор’, ‘Лотос’, ‘Гелио’, ‘Доброе’; яровой пшеницы – ‘Дарья’, ‘Рассвет’, ‘Тома’, ‘Сударыня’, ‘Любава’, ‘Ладья’ и другие, посевы которых ежегодно превышают 1 млн га на полях Беларуси и за ее пределами.

Возглавляя научную школу по селекции растений, С.И. Гриб подготовил четыре доктора и 12 кандидатов наук.

Незаурядные способности Станислава Ивановича как организатора аграрной науки ярко проявились на посту руководителя Западного селекционного центра по зерновым, зернобобовым и крупяным культурам (1978–1991). В это время под его руководством была осуществлена интенсификация и модернизация технологии селекцион-

ного процесса, его техническое переоснащение. Активно развивались в комплексе с академическими институтами исследования селекционного профиля по генетике, физиологии, иммунитету, искусственному климату. Построен и эффективно функционировал один из лучших в СССР фитотронно-тепличный комплекс; было проведено оснащение современной, в основном зарубежного производства, малогабаритной техникой и лабораторным оборудованием; подготовлены профессиональные кадры исследователей.

Получило широкое развитие сотрудничество между селекционными центрами в СССР, а также с ведущими селекционными учреждениями стран СЭВ (Польша, ГДР, ЧССР), Швеции, ФРГ и других стран.

В трудное перестроечное время (1995–2002) знания и опыт организации науки С.И. Гриба были востребованы в ААН РБ. Он избирается вице-президентом, затем академиком секретарем Отделения земледелия и растениеводства. Здесь под его руководством были обобщены и опубликованы важные аналитические итоговые результаты исследований в книге «Адаптивные системы земледелия в Беларуси» (Popkov, 2001). Вместе с академиками М.М. Северневым и И.М. Богдевичем в начале XXI века была инициирована и обоснована стратегия адаптивной интенсификации развития отрасли растениеводства в Республике Беларусь.

Результаты научной и организационной деятельности С.И. Гриба стали основой разработки концепции и методологии создания Национального банка семян генетических ресурсов хозяйственно полезных растений РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию», научного объекта национального достояния Республики Беларусь, эффективного использования генофонда в селекции новых сортов зерновых культур – первоосновы продовольственной безопасности страны (Grib, 1994; 1996; 1998, 2018; Grib et al., 2013; National Strategy…, 2021; Privalov, 2019; Privalov et al., 2013; 2017; Pryvalau et al., 2019).

Станислав Иванович Гриб ведет большую общественную работу, являясь членом ученого совета НПЦ НАН Беларуси по земледелию, национальным координатором Европейской Программы генетических ресурсов растений и заместителем председателя координационного совета по генетическим ресурсам в Республике Беларусь, председателем совета РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию» по защите докторских диссертаций, членом совета БГСХА, заместителем председателя Белорусского общества генетиков и селекционеров, членом научного совета Фонда фундаментальных исследований, членом экспертного совета Государственного комитета по науке

и технологиям Республики Беларусь, членом редколлегии ряда отечественных и зарубежных журналов и научных изданий.

Заслуги С.И. Гриба признаны за рубежом. Он избран иностранным членом Российской академии наук и Национальной академии аграрных наук Украины, почетным профессором Сибирского отделения РАН, членом Евро-

Рис. 1. Академик С.И. Гриб на опытном поле тритикале РУП «НПЦ НАН Беларуси по земледелию», 2022 год.

Fig. 1. Academician S.I. Grib in the experimental triticale field of the Research and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Arable Farming, 2022.

Рис. 2. Академик С.И. Гриб.
Фото из архива НАН Беларуси.

Fig. 2. Academician S.I. Grib.
Photo from the archives of the National Academy of Sciences of Belarus.

Рис. 3. Академик С.И. Гриб выступает на Международной научно-практической конференции в НАН Беларуси. Минск, 2021 год.

Fig. 3. Academician S.I. Grib speaks at the International Scientific and Practical Conference at the National Academy of Sciences of Belarus. Minsk, 2021.

пейской ассоциации селекционеров (EUCARPIA).

Станислав Иванович Гриб награжден орденом «Знак Почета», грамотой Верховного Совета БССР, медалями и дипломами ВДНХ, почетными грамотами НАН Беларуси, Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь и РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию». В 2022 году С.И. Грибу была присуждена учреждённая ВИР медаль имени академика Н.И. Вавилова.»

В 2018 году С.И. Грибу присвоено звание «Заслуженный деятель науки Республики Беларусь». Станислав Иванович – лауреат Премии НАН Беларуси (2022), избран почетным доктором БГСХА, занесен в Книгу Славы Дятловского района Гродненской области (2023).

Сердечно поздравляем Станислава Ивановича с юбилеем, желаем крепкого здоровья, счастья, неиссякаемой энергии и дальнейших творческих успехов на благо Беларуси и мировой науки.

References/Литература

Bulavyna T.M., Yurchenko V.V., Shakuro N.S. (comp.). Stanislav Ivanovich Grib: on the 75th anniversary of his birth (Stanislav Ivanovich Grib: k 75-letiyu so dnya rozhdeniya). Republican unitary enterprise «Research and Practical Center of National Academy of Sciences of the Republic of Belarus for Arable Farming». Minsk: Information and Computing Center Ministry of Finance of the Republic of Belarus; 2019. (Bibliography of Belarusian scientists). [in Russian] (Станислав Иванович Гриб: к 75-летию со дня рождения / сост.: Т.М. Булавина, В.В. Юрченко, Н.С. Шакуро; РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию». Минск: ИВЦ Минфина; 2019. (Библиография ученых Беларуси)).

Buloichik A.A., Dolmatovich N.V., Borzyak V.S., Grib S.I., Shaban E.M. Sreening of the breeding material of soft spring wheat for the presence of resistance genes to brown rust agents. *Zemledeliye i selektsiya v Belarusi = Agriculture and Breeding in Belarus*. 2013;(49):243-250. [in Russian] (Булойчик А.А., Долматович Т.В., Борзяк В.С., Гриб С.И., Шабан Е.М. Скрининг селекционного материала мягкой яровой пшеницы на наличие генов устойчивости к возбудителю бурой ржавчины. *Земледелие и селекция в Беларуси*. 2013;(49):243-250).

Dolmatovich T.V., Buloichik A.A., Borzyak V.S., Grib S.I., Bushtevich V.N. Marking of resistance genes to leaf rust and their expression at different stages of ontogenesis in winter triticale varieties and samples. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian Series.* 2015;(2):54-59. [in Russian] (Долматович Т.В., Булойчик А.А., Борзяк В.С., Гриб С.И., Буштевич В.Н. Маркирование генов устойчивости к бурой ржавчине и их экспрессия на разных стадиях онтогенеза у сортов и перспективных образцов озимого тритикале. *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук = Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук*. 2015;(2):54-59).

Dubovets N.I., Sycheva Y.A., Nosova A.Y., Bondarevich Y.B., Solovey L.A., Shtyk T.I., Grib S.I., Bushtevich V.N., Urozaliev R.A., Aynebekova B.A. Allelic composition analysis of dwarfing genes in varieties and recombinant forms of hexaploid triticale In: *Gene pool and plant breeding: reports and communications of the I International scientific-practical conference. Vol. 1. Field crops*. *(Genofond i selektsiya rasteniy: doklady i soobshcheniya I Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Tom 1. Polevye kul'tury); 2013 April 8-12; Krasnoobsk, Russia*. Novosibirsk; 2013. p.158-165. [in Russian] (Дубовец Н.И., Сычева Е.А., Носова А.Ю., Бондаревич Е.Б., Соловей Л.А., Штык Т.И., Гриб С.И., Буштевич В.Н., Урозалиев Р.А., Айнебекова Б.А. Анализ аллельного состава генов короткостебельности у сортов, сортообразцов и рекомбинантных форм гексаплоидных тритикале. В кн.: *Генофонд и селекция растений: доклады и сообщения I Международной научно-практической конференции. Том 1. Полевые культуры*. *8–12 апреля 2013 г.; пос. Краснообск, Россия*. Новосибирск; 2013. С.158-165).

Gordei I.A., Lyusikov O.M., Belko N.B., Hotyleva L.V., Kaminskaya L.N., Koren L.V., Orlovskaya O.M., Grib S.I., Bushtevich V.N. Chapter 2. Triticale (Tritikale). In: A.V. Kilchevsky, L.V. Khotyleva (sci. eds). *Genetic bases of plant breeding (Geneticheskiye osnovy selektsii rasteniy)*. Minsk: Belaruskaya Navuka; 2010. Vol. 2. p.52-119). [in Russian] (Гордей И.А., Люсиков О.М., Белько Н.Б., Хотылева Л.В., Каминская Л.Н., Корень Л.В., Орловская О.М., Гриб С.И., Буштевич В.Н. Глава 2. Тритикале. В кн.: *Генетические основы селекции растений* / науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. Минск: Беларуская навука; 2010. Т. 2. С.52-119).

Grib S.I. Breeding of intensive varieties of barley in the Byelorussian SSR (Selektsiya intensivnykh sortov yachmenya v Belorusskoy SSR): [dissertation]. Zhodino; 1988. [in Russian] (Гриб С.И. Селекция интенсивных сортов ячменя в Белорусской ССР: дис. ... д-ра с.-х. наук. Жодино; 1988).

Grib S. The problems of plant genetic resources in Belarus and ways to their solution. In: *Proceedings of a joint FAO/IPGRI workshop on ex situ germplasm conservation*/ Food and Agriculture Organization, International Plant Genetic Resourse Institute. Rome; 1994. p.28-30.

Grib S.I. The problem of the gene pool of plant resources (Prablema genafondu raslinnykh resursau). *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series.* 1996;(1):56-59. [in Belarusian] (Грыб С.І. Праблема генафонду раслінных рэсурсаў (Проблема генофонда растительных ресурсов). *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук = Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 1996;(1):56-59).

Grib S. Germbank, methods and results of triticale breeding in Belarus. In: P. Juskiw (ed.). P*roceedings of the 4th International Triticale Symposium; 1998 July 26–31; Red Deer, Alberta, Canada.* International Triticale Association; 1998. Vol. 2. p.127-128.

Grib S. Gene pool, methods and results of triticale breeding in Belarus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian Series*. 2014;(3):40-45. [in Russian] (Гриб С.И. Генофонд, методы и результаты селекции тритикале в Беларуси. *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук = Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук*. 2014;(3):40-45).

Grib S.I. Strategy and priorities of grain crop breeding in Belarus (Strategiya i prioritety selektsii zernovykh kul'tur v Belarusi). *In: Modern trends in scientific support of the agro-industrial complex of the Upper Volga region* (*Sovremennyye tendentsii v nauchnom obespechenii APK Verkhnevolzhskogo regiona*). Ivanovo: PresSto; 2018. Vol. 1. p.467-476. [in Russian] (Гриб С.И. Стратегия и приоритеты селекции зерновых культур в Беларуси. В кн.: *Современные тенденции в научном обеспечении АПК Верхневолжского региона*. Иваново: ПресСто; 2018. Т. 1. С.467-476).

Grib S.I., Koptik I.K. Gene pool and its use in breeding of soft wheat *Triticum aestivum* L. in Belarus. *Proceedings on applied botany, genetics and breeding*. 2009;166:65-72. [in Russian] (Гриб С.И., Коптик И.К. Генофонд и его использование в селекции мягкой пшеницы (*Triticum aestivum*) в Беларуси. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2009;166:65-72).

Grib S.I., Kulinkovich S.N. Development of a cultivar model for spring triticale (Razrabotka modeli sorta dlya yarovogo tritikale). *Agrarian Economics*. 2004;(1):30-32. [in Russian] (Гриб С.И., Кулинкович С.Н. Разработка модели сорта для ярового тритикале. *Агроэкономика*. 2004;(1):30-32).

Grib S.I., Bushtevich V.N., Polyakova E.L., Katser Yu.A., Pilipenko Zh.S. Gene pool and the efficiency of its use in triticale breeding in Belarus (Genofond i effektivnost' yego ispol'zovaniya v selektsii tritikale v Belarusi). In: *Triticale: The proceedings of the international scientifically-practical Conference «The role of*

Triticale in stabilizing grain production, feed and technologies»; 2014 June 4-5; Rostov-on-Don, Russia. Rostov-on-Don; 2014. Iss. 6. p.44-51. [in Russian] (Гриб С.И., Буштевич В.Н., Полякова Е.Л., Кацер Ю.А., Пилипенко Ж.С. Генофонд и эффективность его использования в селекции тритикале в Беларуси. В кн.: *Тритикале: Материалы международной научно-практической конференции «Роль тритикале в стабилизации производства зерна, кормов и технологии их использования»; 4-5 июня 2014 г.; Ростов-на-Дону, Россия*. Ростов-на-Дону; 2014. Вып. 6. С.44-51).

Grib S.I., Bushtevich V.N., Poznyak E.I., Dashkevich M.A. Evaluation of suitability of selection indices for selection of highly productive genotypes of winter triticale under the conditions of Belarus. *Zemledeliye i selektsiya v Belarusi = Agriculture and Breeding in Belarus*. 2021;(57):268-275. [in Russian] (Гриб С.И., Буштевич В.Н., Позняк Е.И., Дашкевич М.А. Оценка пригодности селекционных индексов для отбора высокопродуктивных генотипов тритикале озимого в условиях Беларуси. *Земледелие и селекция в Беларуси*. 2021;(57):268-275).

Grib S.I., Bushtevich V.N., Poznyk E.N., Petrenko N.M., Bandarchuk V.A. Use of cluster analysis for the assessment of the collection of winter triticale varieties. *Zemledeliye i selektsiya v Belarusi = Agriculture and Breeding in Belarus*. 2019;(55):319-324. [in Russian] (Гриб С.И., Буштевич В.Н., Позняк Е.И., Петренко Н.М., Бандарчук В.А. Применение кластерного анализа для оценки коллекции сортов тритикале озимого. *Земледелие и селекция в Беларуси*. 2019;(55):319-324).

Grib S., Koptik I., Morgonov A. The History of Wheat Breeding in Belarus. In: A.P. Bonjean, W.J. Angus, M. van Ginkel (eds). *The World Wheat Book: A History of Wheat Breeding*. Lavoisier, Paris: Technique & Doc; 2016. Vol. 3. p.193-213.

Grib S.I., Matys I.S., Pryvalau F.I. Gene pool of field crops of Belarus and systematic approach to their use in breeding. In: *Gene pool and plant breeding: reports and communications of the I International scientific-practical conference. Vol. 1. Field crops*. *(Genofond i selektsiya rasteniy: doklady i soobshcheniya I Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii. Tom 1. Polevye kul'tury); 2013 April 8-12; Krasnoobsk, Russia*. Novosibirsk; 2013. p.130-137. [in Russian] (Гриб С.И., Матыс И.С., Привалов Ф.И. Генофонд полевых культур Республики Беларусь и системный подход его использования в селекции. В кн.: *Генофонд и селекция растений: доклады и сообщения I Международной научно-практической конференции. Том 1. Полевые культуры. 8-12 апреля 2013 г.; пос. Краснообск, Россия*. Новосибирск; 2013. С.130-137).

Kartel N.A., Khotyleva L.V., Shapturenko M.N., Buloychik A.A., Voluevich E.A., Borzyak V.S., Grib S.I., Koptik I.K. Chapter 1. Wheat (Pshenitsa). In: A.V. Kilchevsky, L.V. Khotyleva (sci. eds). *Genetic bases of plant breeding. Particular genetics of plants (Geneticheskiye osnovy selektsii rasteniy. Chastnaya genetika rasteniy)*. Minsk: Belaruskaya Navuka; 2010. Vol. 2. p.8-51). [in Russian] (Картель Н.А., Хотылева Л.В., Шаптуренко М.Н., Булойчик А.А., Волуевич Е.А., Борзяк В.С., Гриб С.И., Коптик И.К. Глава 1. Пшеница. В кн.: *Генетические основы селекции растений. Частная генетика растений*/ науч. ред. А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева. Минск: Беларуская навука; 2010. Т. 2. С.8-51).

Lemesh V.A., Gryb S.I., Lagunovskaya A.V., Kipen V.N., Buloichik A.A., Bushtevich V.N., Sakovich V.I. KASP genotyping of loci associated with the “1000-grain weight” trait in common wheat (*Tríticum aestívum* L.). *Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*. 2023;67(3):214-221. [in Russian] (Лемеш В.А., Гриб С.И., Лагуновская Е.В., Кипень В.Н., Булойчик А.А., Буштевич В.Н., Сакович В.И. KASP-генотипирование локусов, ассоциированных с признаком «масса 1000 зерен» мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L.). *Доклады Национальной академии наук Беларуси*. 2023;67(3):214-221). DOI: 10.29235/1561-8323-2023-67-3-214-221

National Strategy for the Conservation and Sustainable Use of Plant Genetic Resources for Food and Agriculture in the Republic of Belarus for 2021-2035 (Natsional’naya strategiya po sokhraneniyu i ustoychivomu ispol’zovaniyu geneticheskikh resursov rasteniy dlya proizvodstva prodovol’stviya i vedeniya sel’skogo khozyaystva v Respublike Belarus’ na 2021-2035 gg.). Minsk: Research and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Arable Farming; 2021. [in Russian] (Национальная стратегия по сохранению и устойчивому использованию генетических ресурсов растений для производства продовольствия и ведения сельского хозяйства в Республике Беларусь на 2021-2035 гг. Минск: Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию; 2021).

Popkov A.A. (ed.). Adaptive farming systems in Belarus (Adaptivnyye sistemy zemledeliya v Belarusi). Minsk: Belarusian Research Institute of Agrarian Economics; 2001. [in Russian] (Адаптивные системы земледелия в Беларуси / под общ. ред. А.А. Попкова. Минск: БелНИИ аграрной экономики; 2001).

Privalov F.I. (ed.-in-chief) [et al.]. Plant genetic resources in Belarus: mobilization, conservation, study and use (Geneticheskiye resursy rasteniy v Belarusi: mobilizatsiya, sokhraneniye, izucheniye i ispol’zovaniye). Research and Practical Centre of the National Academy of Sciences of Belarus for Arable Farming. Minsk: Chetyre Chetverti; 2019. [in Russian] (Генетические ресурсы растений в Беларуси: мобилизация, сохранение, изучение и использование / Ф.И. Привалов (гл. ред.) [и др.]. Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию. Минск: Четыре четверти; 2019).

Privalov F.I., Grib S.I., Matys I.S. The crop genebank in the Republic of Belarus. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*. 2013;3(1):12-16. DOI: 10.1134/S2079059713010127

Privalov F.I., Grib S.I., Matys I.S. Conservation management and use of plant genetic resources in the Republic of Belarus. In: *EUCARPIA Genetic Resources 2017. Crop Diversification in a Changing World. Mobilizing the green gold of plant genetic resources: Book of abstracts; 2017 May 8-11; Montpellier, France*. 2017. p.365.

Pryvalau F., Grib S., Matys I. Gene pool of plant resources in Belarus. *The Science and Innovations*. 2019;(8):7-9. [in Russian] (Привалов Ф., Гриб С., Матыс И. Генофонд растительных ресурсов в Беларуси. *Наука и инновации*. 2019;(8):7-9).

Yermishina N.M., Kremenevskaya E.M., Gukasian O.N., Bushtevich V.N., Grib S.I., Lemesh V.A. Use of DNA-markers for development of D/R-substituted forms of triticale with optimal allele composition of *Glu-D1* locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Biological Series.* 2011;(4):41-45. [in Russian] (Ермишина Н.М., Кременевская Е.М., Гукасян О.Н., Буштевич В.Н., Гриб С.И., Лемеш В.А. Использование ДНК-маркеров для создания D/R-замещенных форм тритикале с оптимальным аллельным составом локуса *Glu-D1*. *Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя біялагічных навук = Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия биологических наук*. 2011;(4):41-45).

Zaitseva O.I., Lemesh V.A., Bushtevich V.N., Kilchevsky A.V., Grib S.I. Study of economically valuable traits of doubled haploids of spring triticale (Izucheniye khozyaystvenno-tsennykh priznakov udvoyennykh gaploidov yarovogo tritikale). In: *Agriculture, plant growing, breeding: present and future: collection of materials of the International scientific and practical conference (Zemledeliye, rasteniyevodstvo, selektsiya: nastoyashcheye i budushcheye: sbornik materialov Mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii); 2012 November 5–16; Zhodino, Belarus*. Zhodino; 2012. Vol. 2. p.74-76. [in Russian] (Зайцева О.И., Лемеш В.А., Буштевич В.Н., Кильчевский А.В., Гриб С.И. Изучение хозяйственно-ценных признаков удвоенных гаплоидов ярового тритикале. В кн.: *Земледелие, растениеводство, селекция: настоящее и будущее. сборник материалов Международной научно-практической конференции; 5–16 ноября 2012 г.; Жодино, Беларусь*. Жодино; 2012. Т. 2. С.74-76).

Информация об авторах

Любовь Владимировна Хотылева, доктор биологических наук, профессор, академик НАН Беларуси, почетный директор, Институт генетики и цитологии Национальной академии наук Беларуси, 220072 Беларусь, Минск, ул. Академическая, 27, L.Khotyleva@igc.by, http://orcid.org/0000-0003-0295-5022
Елена Константиновна Хлесткина, доктор биологических наук, профессор РАН, директор, Федеральный исследовательский центр Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (ВИР), 190000 Россия, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, 42, 44, director@vir.nw.ru, https://orcid.org/0000-0002-8470-8254
Ирина Станиславовна Матыс, кандидат сельскохозяйственных наук, доцент, заведующая, Отдел генетических ресурсов растений, Научно-практический центр НАН Беларуси по земледелию, 222160 Беларусь, Жодино, ул. Тимирязева, 1, belgenbank@izis.by

Information about the authors

Lyubov V. Khotyleva, Dr. Sci. (Biology), Professor, Academician of the National Academy of Sciences of Belarus, Honorary Director, Institute of Genetics and Cytology of the National Academy of Sciences of Belarus, 27, Akademicheskaya Street, Minsk, 220072 Belarus, L.Khotyleva@igc.by, http://orcid.org/0000-0003-0295-5022
Elena K. Khlestkina, Dr. Sci. (Biology), Professor of the Russian Academy of Sciences (RAS), Director, N.I. Vavilov All-Russian Institute of Plant Genetic Resources (VIR), 42, 44, Bolshaya Morskaya Street, St. Petersburg, 190000 Russia, director@vir.nw.ru, https://orcid.org/0000-0002-8470-8254
Irina S. Matys, Cand. Sci, (Agriculture), Associate Professor, Head, Plant Genetic Resources Department, Research and Practical Center of the National Academy of Sciences of the Republic of Belarus for Arable Farming, 1, Timiriyazeva Street, Zhodino, 222160 Belarus, belgenbank@izis.by

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 13.08.2024; одобрена после рецензирования 27.08.2024; принята к публикации 13.09.2024.
The article was submitted on 13.08.2024; approved after reviewing on 27.08.2024; accepted for publication on 13.09.2024.

Биотехнология и селекция растений / Plant Biotechnology and Breeding

Научный рецензируемый журнал / Scientific Peer Reviewed Journal

IISSN 2658-6266 (Print); ISSN 2658-6258 (Online)
4 номера в год (ежеквартально) / Publication frequency: Quarterly
https://biosel.elpub.ru; e-mail: pbi@vir.nw.ru

Языки: русский, английский / Languages: Russian, English
Индексируется в РИНЦ (НЭБ), DOAJ, AGRIS, входит в перечень изданий, публикации которых учитываются Высшей аттестационной комиссией России (ВАК РФ) при защите диссертаций на соискание ученых степеней кандидата и доктора наук / Indexed/abstracted by the Russian Science Citation Index on eLIBRARY.RU platform, DOAJ, AGRIS, included in the list of publications recognized by the Russian Higher Attestation Commission (VAK RF) when candidate and doctoral dissertations are defended.

Открытый доступ к полным текстам / Open access to full texts:
https://biosel.elpub.ru
http://www.vir.nw.ru/pbi/
https://www.elibrary.ru/title_about_new.asp?id=69575

Требования к статьям и правила рецензирования, электронный архив в открытом доступе и иная дополнительная информация размещены на сайте журнала https://biosel.elpub.ru / Full information for authors, reviewers, and readers (open access to electronic versions and subscription to print editions) can be found at https://biosel.elpub.ru

Прием статей через электронную редакцию на сайте журнала https://biosel.elpub.ru. Предварительно необходимо зарегистрироваться как автору, затем в правом верхнем углу страницы выбрать «Отправить рукопись». После завершения загрузки материалов обязательно выбрать опцию «Отправить письмо», в этом случае редакция автоматически будет уведомлена о получении новой рукописи / Manuscripts are accepted via the online editing resource at the Journal's website https://biosel.elpub.ru. The sender needs to register as the author and select in the upper righthand corner "Send a manuscript". After the loading of the materials, the option "Send a letter" is to be chosen, so that the editors would be automatically informed that a new manuscript has been received.

Научный редактор: *д.б.н. Е.И. Михайлова*
Переводчик: *С.В. Шувалов*
Корректор: *С.В. Шувалов , Е.И. Михайлова*
Компьютерная верстка: *Г.К. Чухин*

Адрес редакции:
Россия, 190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 42
Тел.: (812) 314-49-14; e-mail: pbi@vir.nw.ru; i.kotielkina@vir.nw.ru
Почтовый адрес редакции
Россия, 190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 42, 44

Подписано в печать 27.09.2024. Формат 70×100 1/8.
Бумага офсетная. Печать офсетная.
Печ. л.8,5. Тираж 30 экз. Заказ № 383/3.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова» (ВИР),
редакционно-издательский сектор ВИР

Россия, 190000, Санкт-Петербург, ул. Большая Морская, д. 42

Индивидуальный предприниматель
Юшкевич Галина Викторовна
192286, Санкт-Петербург, Альпийский пер., д. 45

БИОТЕХНОЛОГИЯ
И СЕЛЕКЦИЯ
РАСТЕНИЙ

7(3), 2024