

Юйтин Сяо¹, аспирант

И. Б. Саук¹, старший научный сотрудник

А. И. Чайковский², кандидат сельскохозяйственных наук, директор

Е. С. Досина-Дубешко², кандидат сельскохозяйственных наук, доцент,
заместитель директора по научной работе

В. С. Анохина¹, кандидат биологических наук, доцент кафедры
генетики, заведующий сектором генетики растений НИЛ
молекулярной генетики и биотехнологии

¹ Белорусский государственный университет, г. Минск

² РУП «Институт овощеводства», аг. Самохваловичи, Минский район

ОЦЕНКА СОРТОВ И МУТАНТНЫХ ЛИНИЙ ФАСОЛИ ОБЫКНОВЕННОЙ (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) ПО СЕЛЕКЦИОННО ЗНАЧИМЫМ ПРИЗНАКАМ

РЕЗЮМЕ

*Приведены результаты трехлетней сравнительной оценки созданных в БГУ перспективных мутантных линий разных поколений и их исходных сортов фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris* L.) по комплексу селекционных ценных признаков в полевых и лабораторных условиях. Изучены биометрические параметры растений: всхожесть, выживаемость, элементы семенной продуктивности и их корреляционные связи. Отмечено влияние года возделывания растений, генотипа сорта и мутанта на изменчивость признаков. Установлены для отдельных образцов редкие компоненты спектров запасных белков, а также различная реакция генотипов по заболеваемости проростков при воздействии на семена суспензии спор *Colletotrichum lindemuthianum*. Приведены результаты ДНК-маркирования геномов опытных форм по четырем генам (*Co-1*⁴, *Co-2*, *Co-4*, *Co-6* и их аллелей), детерминирующих устойчивость растений к антракнозу.*

Ключевые слова: антракноз, генотип, ДНК-маркер, проросток, запасной белок, фасоль обыкновенная.

ВВЕДЕНИЕ

Фасоль – основной источник калорий и белка для населения многих стран мира, поэтому она относится к социально важной культуре [1]. Среди овощей фасоль является неповторимым источником ценных биохимических веществ. Благодаря высокой биологической и технологической ценности белков фасоль находит применение в качестве специфических добавок в хлебопекарной, макаронной, кондитерской и других отраслях пищевой промышленности [2]. Как отмечают некоторые авторы [3, 4], фасоль выращивают в более

чем 150 странах мира на площади 38 млн га, а ее производство к 2011 г. достигло 16,294 млн т.

Проблема производства растительного белка является актуальной как в мировом, так и в отечественном сельском хозяйстве [5, 6]. Среди продовольственных бобовых культур фасоль выделяется питательностью и многообразием ее использования для пищевых целей. Основным фактором, препятствующим выращиванию фасоли на зерно в условиях Беларуси, – отсутствие сортов, приспособленных для культивирования в наших почвенно-климатических условиях. Сроки созревания большинства районированных сортов приходятся на сентябрь, что ввиду влажной, холодной погоды в этот период препятствует вызреванию семян на корню и механизированному обмолоту растений [6], а поздние весенние заморозки приводят к вымерзанию всходов. Высокие же температуры вызывают стерильность пыльцы, что снижает завязываемость бобов. Для удовлетворения потребностей населения Республики Беларусь в фасоли в состоянии технической и биологической спелости необходимы новые высокопродуктивные сорта, устойчивые к болезням и соответствующие морфотипам растений, пригодных для механизированной уборки. Реализация модели такого адресноориентированного сорта и разработка методов его создания требуют наличия источников прогнозируемых признаков с их идентификацией по всем селекционно значимым показателям [6].

С целью расширения генетического разнообразия в селекции фасоли широко используется индуцированный и спонтанный мутагенез [7, с. 400–408]. Широкое использование индуцированных мутантов в мировом масштабе привело к созданию и выделению более 3 000 сортов более чем у 2 014 различных видов растений, в том числе и зернобобовых культур – фасоль, горох, люпин, соя и др. [8]. Установлено наличие корреляционных связей между окраской цветков и семян у фасоли обыкновенной: белые семена – белые цветки, черные семена – фиолетовые цветки, коричневые семена – розовые цветки. Высота заложения нижнего боба зависит от общей высоты растения [7]. Эта информация важна для отбора перспективных форм в селекционных посевах и проведения генанализа их генотипов.

В коллекции мировых генетических ресурсов зерновых бобовых ВИР к 2014 г. было более 7 678 образцов фасоли 5 видов [3, 5]. Из коллекции ВИР при ее испытании многими авторами [9–11] выделены источники скороспелости, продуктивности, высокого содержания белка, засухо- и холодоустойчивости, устойчивости к антракнозу и вирусным болезням. Разработаны стратегия и методы оценки полиморфизма генетических ресурсов растений, теория и технология селекции овощных культур с комплексной устойчивостью к болезням и определены основные направления работ. Получено более 60 сортов фасоли [5, 11].

Для фасоли как высокобелковой культуры характерно наличие значительного полиморфизма по белковым спектрам. При изучении спектров запасных белков у зернобобовых культур [12–14] показано наличие как часто встречаемых фракций, так и редких, уникальных для конкретных

генотипов. Это послужило основой для использования таких фракций в качестве маркерных признаков в селекции, семеноводстве, при паспортизации образцов и защите авторских прав.

Широкому распространению культуры фасоли препятствуют различные болезни, которые снижают до 40 % и более продуктивность растений и качество получаемой продукции. Наиболее вредоносным в республике является антракноз. Успех селекции на устойчивость к болезням определяется наличием доноров и источников устойчивости.

В результате изучения бобовых и зерновых культур выделены молекулярно-биохимические маркеры по спектрам запасных белков, что актуально для поиска конкретных генотипов, их паспортизации и защиты авторских прав [14, 15].

Для улучшения образцов фасоли важны и генетические подходы, при которых используются генетические маркеры в качестве критериев для отбора ценных генотипов. Поэтому при выделении генотипов фасоли с генами устойчивости к антракнозу необходимо молекулярно-генетическое тестирование особенно вновь созданных или интродуцируемых генотипов фасоли овощной. На данный момент в мире установлено наличие около 40 генов устойчивости к антракнозу у культуры фасоли [16]. Наибольший интерес представляет изучение образцов фасоли на наличие гена устойчивости к антракнозу *Co-1⁴*, сцепленного с геном устойчивости к угловатой пятнистости *Phg-1* [17], а также генов устойчивости к антракнозу *Co-2* [18], *Co-4* [19–21], *Co-6* [19], широко используемых в селекции.

В Республике Беларусь отсутствуют данные по молекулярно-генетическому тестированию коллекционных, селекционных и культивируемых образцов по указанным генам. Ограничена информация по оценке генотипов на устойчивость к антракнозу в сочетании с другими селекционно ценными признаками, прежде всего, у вновь созданных мутантов и интродуцируемых образцов. Поэтому актуальным является использование комплексного подхода при скрининге коллекционных образцов по спорофиту и молекулярно-генетическому тестированию для выделения перспективных генотипов без создания провокационных фонов. Выделение устойчивых генотипов позволит значительно увеличить продуктивность растений и снизить распространение грибных инфекций на посевах фасоли. Результаты работ по мутагенезу у ряда культур послужили основой использования физического мутагенеза в нашей работе для расширения спектра изменчивости селекции значимых признаков.

Цель работы – оценить сорта и мутантные линии фасоли обыкновенной по структуре урожая, спектрам запасных белков, устойчивости к антракнозу с использованием проростков, провести молекулярно-генетическое маркирование генотипов на наличие в их геномах генов устойчивости к антракнозу (*Co-1⁴*, *Co-2*, *Co-4*, *Co-6*) и выделить источники ценных признаков для селекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В эксперименте использовали семена трех сортов: Паланачка ранняя (Пр) – сорт сербской селекции, Секунда (С) [22] и Триумф сахарный 764 (Тс) – сорта

российской селекции [23], а также мутантные линии разных поколений от этих сортов, полученные в БГУ после предпосевной обработки их семян ^{60}Co в дозе 194 Гр на установке МРХ–гамма-25М.

У сорта Паланачка ранняя после воздействия ^{60}Co изучены потомства трех поколений отдельных семей: семья первого поколения М3-М5 (Пр С1), семья второго поколения М4-М6 (Пр С2) и семья третьего поколения М5-М7 (Пр С3), не имеющих изменений по окраске цветков и семян. У сорта Триумф сахарный 764 в поколении М3 были выделены формы с новыми окрасками семян в сравнении с исходным сортом и обозначенные нами: ТсМЛ1, ТсМЛ2 – с коричневой окраской семян, ТсМЛ3О – с оливковой, ТсМЛ4 – с черной, ТсМЛ3Б, ТсМЛ6 – с белой, ТсМЛ7 – с темно-коричневой окраской семян. У сорта Секунда после воздействия ^{60}Co не было отмечено изменений окраски цветков и семян у растений мутантных популяций (СМЛ).

Изучение образцов проводили в течение трех лет (2017–2019 гг.) в ботаническом саду БГУ, расположенном на юго-западной окраине г. Минска в районе деревни Щомыслица (53°49' с. ш., 27°27' в. д.). Земельный участок ботанического сада БГУ относится к Ошмянско-Минскому агропочвенному району [24]. Посев семян проведен мелкоделяночным способом с соблюдением норм высева семян по методике ВИР [25] в 2017–2019 гг. в третьей, второй и первой декадах мая соответственно по годам. Исследования включали оценку полевой всхожести семян, выживаемости растений, анализ элементов семенной продуктивности растений, устойчивость к антракнозу, определение компонентного состава запасных белков и молекулярное маркирование геномов опытных образцов. По качественным признакам вегетативных и генеративных органов, продолжительности вегетационного периода и показателям семенной продуктивности определяли различия фенотипов мутантов от исходного сорта. По показателю выживаемости растений учитывали их устойчивость к факторам среды, а по фенотипическим характеристикам – наличие болезни. Анализ структуры продуктивности проводили по следующим признакам: число бобов, семян, масса семян с растения и масса 1 000 семян с определением среднего значения, коэффициента вариации (CV) каждого признака, величин корреляционной зависимости (r) в соответствии с методикой ВИР [26].

Состав запасных белков изучали в зрелых семенах. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили по Лэммли в модификации [27, 28]. Учет компонентов белковых спектров осуществляли, используя в качестве стандарта молекулярного веса белков наборы: M-Protein MW Marker BlueClassic и M-Protein MW Marker BlueEye (Jena Bioscience Germany). Анализ компонентов спектра и обсуждение результатов выполнено по рекомендации [29].

Для определения устойчивости образцов фасоли к антракнозу использовали метод оценки по проросткам семян в чашках Петри. Семена перед закладной экспериментом дезинфицировали 70 %-м этиловым спиртом, после чего промывали автоклавированной дистиллированной водой. В опытных вариантах семена инокулировали в течение 60 минут суспензией спор гриба

Colletotrichum lindemuthianum, споровая нагрузка которого составила $1,1 \times 10^6$ спор в 1 мл суспензии, затем промывали дистиллированной водой и закладывали в чашках Петри, которые помещали в термостат с температурой $+15\text{ }^\circ\text{C}$ на 11 суток, после чего проводили анализ процента прорастания семян, длины корешка и гипокотила, процента поражения проростков. Выборка для каждого варианта составила по 20 семян как в контроле, так и в опыте.

Экспериментальные данные обработаны статистически с использованием пакета программ Excel. Для различных независимых пар данных рассчитывали значение t-критерия Стьюдента. Проростки семян изученных сортов на основе их поражения ранжированы по шкале устойчивости, представленной в таблице 1.

Геномная ДНК из проростков фасоли была выделена с помощью набора Plant DNA Preparation Kit (Jena Bioscience) согласно инструкции производителя. Реакционная смесь содержала: ДНК – 2,5 нг/мкл, праймеры – 0,25 мкмоль каждого, PrimeTaq ДНК полимеразы – 0,5 U, ПЦР буфер однократный, 0,8 ммоль dNTP, 2,0 ммоль MgCl_2 . ПЦР проводили с помощью термоциклера Agilent Technologies Sure Cyler 8800. Электрофоретическое разделение фрагментов – с помощью камеры для электрофореза Helicon (Россия) и источника питания Эльф-4 (ДНК-технология) в 2 %-м агарозном геле при 80 В, 170 мА. В лунки вносили по 10 мкл полученной после рестрикции смеси фрагментов ДНК. В работе использовали ДНК-маркеры молекулярного веса М 100 бп и 1Кб ОДО «Праймтех». Для ПЦР использовали праймеры: CV54 2014 к гену *Co-1⁴*, TGA к гену *Phg-1* [17], SQ 4 к гену *Co-2* [18], SY20 и SC08 к гену *Co-4* [19], SAS13 [20] и SBB14 [21] к аллелю *Co-4²*, SZ04 и SZ20 к гену *Co-6* [19], синтезированных ОДО «Праймтех», г. Минск.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В полевых условиях трижды учитывали всхожесть семян опытных образцов, по результатам которой судили о качестве семенного материала и рассчитывали процент выживаемости растений. Отмечены фенотипические признаки растений и семян (табл. 2).

Полевая всхожесть семян сорта Паланачка ранняя была от 95 % (2017 г.) до 65 % (2019 г.). Тенденция низкой полевой всхожести семян в 2019 г. отмечена и у семян мутантных популяций этого сорта М5-М7 поколений. Возможно, 2019 г. был неблагоприятным для прорастания семян в полевых условиях, что и привело к понижению всхожести. Показатели выживаемости растений

Таблица 1 – Шкала устойчивости [30]

Устойчивость	Поражение проростков, %
1 – очень низкая	Очень сильное > 50 %
3 – низкая	Сильное 26–50 %
5 – средняя	Среднее 11–25 %
7 – высокая	Слабое 2,5–10 %
9 – очень высокая	Отсутствует или очень слабое, меньше < 2,5 %

Таблица 2 – Характеристика сортов и мутантных форм фасоли обыкновенной по всхожести семян и выживаемости растений, %

Образец	Всхожесть семян			Выживаемость растений		
	2017 г.	2018 г.	2019 г.	2017 г.	2018 г.	2019 г.
Пр, сорт	95,00	93,33	65,00	94,74	71,43	92,31
Пр С1	97,50	86,88	57,00	89,48	73,42	95,32
Пр С2	80,00	81,94	35,00	100,00	77,80	97,22
Пр С3	85,00	88,61	36,00	94,12	85,78	100,00
С, сорт	71,43	100,00	70,00	100,00	100,00	85,71
СМЛ	95,00	100,00	100,00	92,98	94,64	100,00
Тс, сорт	85,00	100,00	60,00	88,24	80,00	83,33
ТсМЛЗБ	80,00	95,00	18,00	87,50	81,58	100,00
ТсМЛЗО	80,00	95,00	70,00	87,50	78,95	85,71
ТсМЛ4	90,00	85,00	77,30	94,44	82,35	97,58
ТсМЛ6	90,00	78,50	31,50	88,89	87,88	89,11
ТсМЛ1	67,78	75,00	90,00	9,80	66,67	97,78
ТсМЛ2	71,20	43,75	86,00	3,40	42,86	86,05
ТсМЛ7	86,67	92,69	78,33	78,54	83,89	89,44

в отдельных мутантных популяциях Пр С1-С3 были выше, чем у исходного сорта (см. табл. 2). Вероятно, это было следствием многократного отбора более устойчивых растений.

У сорта Триумф сахарный 764 и его мутантных линий не отмечено достоверного снижения показателей всхожести семян и выживаемости растений по годам, за исключением форм ТсМЛ1 и ТсМЛ2, которые характеризуются меньшей выживаемостью растений в первый год изучения (9,80 и 3,40 % соответственно).

Сорт Секунда и его мутантные формы имели белую окраску цветков, горчичную окраску семян и светло-зеленую окраску листьев. По всхожести семян и выживаемости растений все эти формы были более стабильными по годам и не превышали исходный сорт. У сорта Паланачка ранняя и всех растений мутантных популяций разных семей отмечена белая окраска цветков и светло-зеленая окраска листьев. В нашем опыте среди изученных растений разных семей и поколений, полученных на базе сортов Паланачка ранняя и Секунда, не установлено появления растений с измененными фенотипами.

У сорта Триумф сахарный 764 и мутантных линий (ТсМЛ1, ТсМЛ2, ТсМЛ4, ТсМЛ7) отмечены лиловые цветки и темно-зеленые листья. Мутантная линия ТсМЛ6 обладала белыми цветками и зелеными листьями. Линия ТсМЛ3(О) имела лиловые цветки и темно-зеленые листья, в ряду поколений у нее выщеплялись растения с белыми цветками и зелеными листьями, которые имели и белую окраску семян (эти растения выделены нами в линию ТсМЛ3(Б)).

Проведен структурный анализ (табл. 3) урожая семян (среднее по трем годам изучения) у исследуемых образцов фасоли по признакам: число бобов и семян на одном растении, масса семян с одного растения и масса 1 000

Таблица 3 – Структурный анализ урожая семян и коэффициент вариации (CV, %) признаков изученных образцов фасоли, среднее за 2017–2019 гг.

Образец	Признаки							
	число, шт/растение				масса, г			
	бобов		семян		семян с растения		1 000 семян	
	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV	\bar{x}	CV
Пр, сорт	17,61	49,37	76,11	56,64	20,87	58,01	268,00	10,68
Пр С1	20,26	55,79	74,88	56,43	21,44	59,00	272,33	15,14
Пр С2	15,58	50,00	67,82	56,27	19,09	58,85	264,87	18,28
Пр С3	16,29	48,96	66,71	56,42	19,34	58,97	274,79	10,82
С, сорт	7,64	33,76	20,63	59,44	7,55	56,07	384,64	18,58
СМЛ	7,60	42,69	20,18	52,30	7,96	52,69	396,28	16,31
Тс 764, сорт	7,84	43,28	22,33	60,03	6,89	58,66	302,13	16,28
ТсМЛЗБ	21,66	59,65	64,64	78,67	14,91	85,24	229,81	20,76
ТсМЛЗО	18,38	66,03	64,44	72,44	15,13	72,54	242,79	13,46
ТсМЛ4	13,58	51,14	47,50	53,41	15,45	55,84	325,37	17,10
ТсМЛ6	13,62	67,17	48,46	89,16	13,18	91,04	271,11	20,37
ТсМЛ1	15,08	59,63	60,57	63,16	17,64	68,85	298,83	20,41
ТсМЛ2	16,24	50,94	50,43	50,47	16,86	55,08	343,47	13,81
ТсМЛ7	11,98	47,78	39,18	51,28	14,43	53,63	355,69	12,17

семян. По признаку «число бобов на одном растении» достоверное превышение над исходным сортом Паланачка ранняя отмечено только у мутантной популяции Пр С1 в 2019 г. Коэффициент вариации по этому признаку у данной семьи за три года изучения составил в среднем 55,79 %, что выше показателей исходного сорта. Однако по числу и массе семян с одного растения у изученной семьи не установлено превышения над исходным сортом по среднему значению этих признаков, а также не выявлено различий по коэффициенту их вариации. У семей Пр С2 и Пр С3 достоверных превышений по изученным признакам над исходным сортом Паланачка ранняя не отмечено. Таким образом, среди исследуемых форм мутантных линий сорта Паланачка ранняя, превосходящих исходный сорт и сохраняющих эти свойства в ряду поколений, не установлено.

Растения мутантной популяции Секунда МЛ по элементам семенной продуктивности не превышали исходный сорт Секунда по всем изученным признакам за три года как по средним значениям, так и по коэффициенту их вариации.

По признакам «число бобов», «число семян с одного растения» и «масса семян с одного растения» у всех мутантных линий сорта Триумф сахарный 764 отмечено достоверное превышение над исходным сортом по величине средних значений, а CV изученных признаков у линий ТсМЛЗ, ТсМЛ6 и ТсМЛ1 был выше, чем у исходного сорта, с варьированием по годам. Линия ТсМЛ4 по числу семян и массе семян с одного растения была самая стабильная при сравнении CV этих признаков за три года изучения.

Полученные результаты по элементам семенной продуктивности (см. табл. 3) свидетельствуют о влиянии генотипа сорта на величину изменчивости

мерных признаков в ряду мутантных поколений фасоли обыкновенной. Сохранение в ряду изученных поколений выявленных положительных изменений у мутантных растений в сравнении с исходным сортом было характерно только для мутантных линий сорта Триумф сахарный 764. Отмечено и влияние года исследований на величину анализируемых показателей как у сортов, так и их мутантных линий.

Ввиду установленных отличий между сортами и их мутантными линиями и значительной флуктуации внутри отдельных мутантных популяций нами были рассчитаны коэффициенты корреляции (r) между изученными параметрами признаков у сортов и их мутантных форм.

На рисунке 1 показано, что действие мутагена влияло на величину коэффициента корреляции. Исходный сорт Триумф сахарный 764 характеризовался большим количеством положительных корреляций между признаками. Из всех изученных мутантных популяций Триумфа сахарного 764 популяция ТсМЛ4 оказалась более стабильной по наличию и силе корреляционных связей: три сильных (число бобов – число семян, число бобов – масса семян, число семян – масса семян), три средних (число плодоносящих ветвей – число бобов, число плодоносящих ветвей – число семян, число плодоносящих ветвей – масса семян). Изучение у мутантов характера и величины корреляций между биометрическими показателями выявило их изменения и у других сортов в сравнении с их мутантами. Полученная информация важна для выбора исходных форм для гибридизации и дифференцировки селекционных форм. Изменение корреляционной зависимости мерных признаков у фасоли и других культур от воздействия разных стрессорных факторов показано в ряде работ [11, 31].

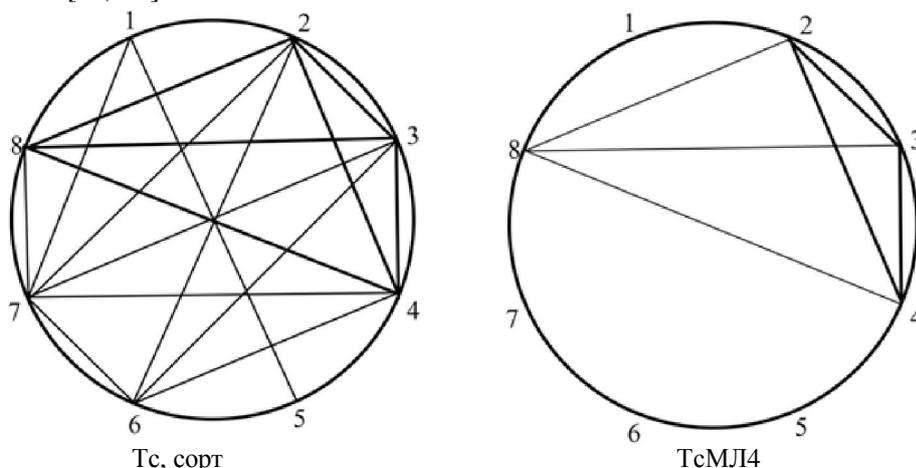


Рисунок 1 – Направление и величина (r) корреляционных связей у сорта Тс 764 и его мутанта: 1 – ДВП, 2 – число бобов, 3 – число семян, 4 – масса семян, 5 – масса 1 000 семян, 6 – высота до первого побега, 7 – общая высота, 8 – число плодоносящих ветвей

————— – сильная корреляционная связь ($|r| \geq 0,7$)
 ————— – средняя корреляционная связь ($0,4 \leq |r| \leq 0,7$)

Белковые спектры запасных белков исследуемых образцов фасоли обыкновенной представлены на рисунке 2. Электрофоретический анализ запасных белков семян фасоли в полиакриламидном геле показал высокое сходство между всеми генотипами, однако было обнаружено несколько характерных отличий в белковом спектре у отдельных образцов. У всех образцов присутствуют основные общие белковые фракции **с, д, ж, и, м, т**.

У растений сорта Паланачка ранняя и его мутантов (Пр С1, Пр С2, Пр С3) и мутантов сорта Триумф сахарный 764 (ТсМЛ6 и ТсМЛ2) наблюдается экспрессия белка **б**. В спектре белка мутантов (ТсМЛ7, ТсМЛ3, ТсМЛ4, ТсМЛ1) и сорта Триумф сахарный 764, сорта Секунда и его мутанта СМЛ белок **б** отсутствует, но экспрессируется белок фракции **а** с большей молекулярной массой. Кроме того, у сорта Секунда и его мутанта СМЛ отмечена фракция **г**, у остальных изученных образцов белок **г** отсутствует, но у этих образцов отмечен белок фракции **в** с большей молекулярной массой (около 72 кДа). У образцов Триумф сахарный 764 и мутантов ТсМЛ4, ТсМЛ1, ТсМЛ2, ТсМЛ7, у сорта Секунда и его мутанта СМЛ наблюдается фракция **е** (около

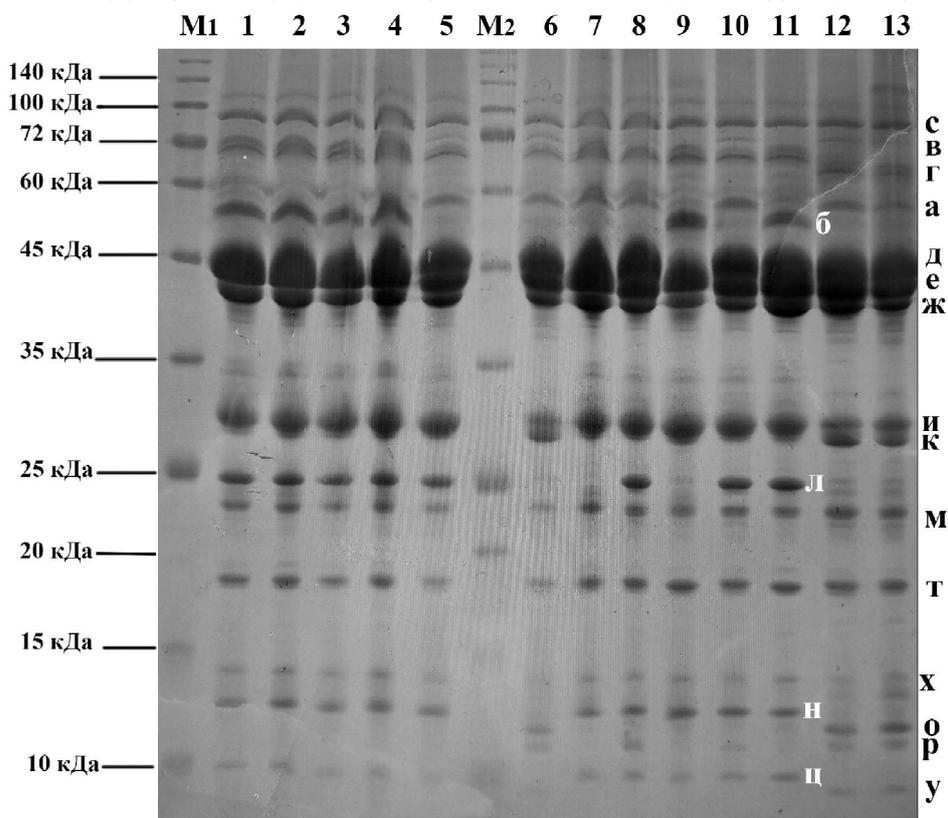


Рисунок 2 – Спектр запасных белков опытных образцов фасоли:
 М1 – Protein MW Marker BlueClassic (Jena Bioscience), М2 – Protein MW Marker BlueEye (Jena Bioscience), 1 – Пр, сорт; 2 – Пр С1; 3 – Пр С2; 4 – Пр С3; 5 – ТсМЛ7; 6 – Тс, сорт; 7 – ТсМЛ3; 8 – ТсМЛ4; 9 – ТсМЛ6; 10 – ТсМЛ1; 11 – ТсМЛ2; 12 – С, сорт; 13 – СМЛ

45 кДа). Фракции **к** и **о** присутствуют только у трех образцов: сорт Триумф сахарный 764, сорт Секунда и мутант СМЛ. Растения сорта Паланачка ранняя, Триумф сахарный 764 и все их мутантные линии имеют белок фракции **н**, кроме сорта Триумф сахарный 764. Фракция **р** обнаружена у сорта Триумф сахарный 764, мутантов ТсМЛ4, ТсМЛ1, у сорта Секунда и мутанта СМЛ. Фракции **л** (25 кДа) наблюдается у всех линий Пр и мутантов ТсМЛ7, ТсМЛ4, ТсМЛ1 и ТсМЛ2. Белок с молекулярной массой около 10 кДа (фракции **ц**) присутствует во всех образцах, кроме сорта Секунда и его мутанта СМЛ, в которых вместо него наблюдается другая белковая фракция (**у**) с меньшей молекулярной массой. Обсуждение результатов проведено согласно указанию [29].

Выявлен широкий полиморфизм спектров запасных белков у изученных образцов: редкие фракции белка для мутантов (фракция **б** – ТсМЛ7, ТсМЛ3; фракция **л** – ТсМЛ7, ТсМЛ4, ТсМЛ1 и ТсМЛ2), которые могут быть использованы как маркеры этих генотипов.

Результаты изучения устойчивости к антракнозу по проросткам у мутантных линий и исходных сортов фасоли обыкновенной представлены в таблице 4. Поскольку в данном исследовании использовали семена экспериментальных образцов разных лет репродукции, полученные данные были усреднены за два года (2018 и 2019 гг.).

Проращение семян в контрольных вариантах эксперимента у исходного сорта Паланачка ранняя составило 60,00 %, тогда как у всех мутантных форм разных поколений этот показатель был выше. У исходных сортов Секунда и Триумф сахарный 764 проращение семян характеризовалось большим процентом и достигало 94,45 и 97,37 % соответственно.

Мутантная форма СМЛ существенно не отличалась от исходного сорта Секунда по данному параметру. Мутантные линии Триумфа сахарного – ТсМЛ2, ТсМЛ4, ТсМЛЗБ – характеризовались высоким проращением семян (от 97,5 до 100,0 %). У линий ТсМЛЗО, ТсМЛ1, ТсМЛ6 и ТсМЛ7 этот показатель был ниже (от 85,0 до 87,5 %). В опытных вариантах эксперимента (после воздействия суспензии спор патогена на семена) проращение семян у исходного сорта Паланачка ранняя и его мутантных популяций разных поколений снизилось (у сорта до 32,5 %, у мутантов от 62,5 до 20,0 %). Балл поражения проростков достигал 100,0 %. По длине корешка и гипокотилия проростка достоверное снижение отмечено только у мутанта ПрМ1. По результатам эксперимента у этих форм балл устойчивости минимальный (1), устойчивых форм не обнаружено.

Сорт Секунда и его мутантная форма по проценту проращения семян в опытно-материальном варианте эксперимента не отличались от контрольного варианта. Процент поражения проростков составил 25,0 и 7,5 %, балл устойчивости 5 и 7 соответственно. У мутантной формы СМЛ по длине корешка и гипокотилия достоверное превышение над контролем отмечено только по длине гипокотилия. Наибольшее разнообразие по изученным параметрам отмечено у мутантных линий сорта Триумф сахарный 764. По результатам исследования

Таблица 4 – Характеристика экспериментальных образцов фасоли по устойчивости к антракнозу, среднее за 2018–2019 гг.

Образец	Контроль			Опыт			Поражение проростков, %	Балл устойчивости
	Прорастание семян, %	Длина $\bar{x} \pm S_x$, см		Прорастание семян, %	Длина $\bar{x} \pm S_x$, см			
		корешка	гипокотыля		корешка	гипокотыля		
Пр, сорт	60,00	4,83±0,64	2,88±0,36	32,50	10,25±0,89***	4,78±0,57**	100,00	1
Пр С1	90,00	6,74±0,82	4,16±0,34	20,00	2,94±0,16***	1,91±0,16***	100,00	1
Пр С2	72,50	5,52±0,56	2,58±0,14	22,50	4,61±0,78	4,18±0,81	100,00	1
Пр С3	92,50	6,83±0,91	3,21±0,29	62,50	5,08±0,57	3,69±0,30	100,00	1
С, сорт	94,45	7,02±0,69	2,89±0,26	91,67	7,94±0,80	3,23±0,34	25,00	5
СМЛ	100,00	7,95±0,76	2,70±0,23	95,00	9,71±0,89	4,74±0,27***	7,50	7
Тс, сорт	97,37	6,43±0,83	1,85±0,12	97,37	6,38±0,96	3,08±0,29***	10,50	5
ТсМЛЗБ	100,00	5,41±0,60	1,89±0,34	62,50	6,30±0,86	3,45±0,44**	52,50	1
ТсМЛЗО	82,50	8,23±1,08	3,67±0,40	97,50	10,03±1,06	4,96±0,43*	5,00	7
ТсМЛ4	97,50	5,85±0,58	3,36±0,21	97,50	8,63±1,17*	6,59±0,73***	5,00	7
ТсМЛ6	85,00	7,18±0,73	2,05±0,12	22,50	4,93±0,73*	1,50±0,32	95,00	1
ТсМЛ1	85,00	6,65±0,65	1,74±0,12	70,00	4,15±0,60***	2,99±0,16***	65,00	1
ТсМЛ2	97,50	6,94±0,73	2,27±0,24	97,50	10,58±0,99**	4,10±0,34***	2,50	7
ТсМЛ7	87,50	6,39±0,72	2,46±0,22	67,50	6,61±1,22	4,63±0,55***	40,00	3

Примечание. Контроль – без воздействия патогена; опыт – после воздействия патогена.

* Разница с контролем достоверна при $P < 0,05$;** Разница с контролем достоверна при $P < 0,01$;*** Разница с контролем достоверна при $P < 0,001$.

к высокоустойчивым на воздействие суспензии спор патогена отнесены линии ТсМЛ2, ТсМЛ3О и ТсМЛ4.

Таким образом, лабораторный анализ устойчивости к антракнозу выявил разную реакцию образцов фасоли на воздействие патогена и позволил дифференцировать образцы по баллам устойчивости.

В соответствии с целью работы опытные образцы фасоли промаркированы на наличие генов устойчивости к антракнозу: *Co-1⁴* (и сцепленного с ним гена устойчивости к угловатой пятнистости *Phg-1*), *Co-2*, *Co-4*, *Co-6*. Результаты проведенных исследований по гену *Co-4²* представлены на рисунке 3, а в таблице 5 дана сводная информация по результатам тестирования геномов по всем изученным генам.

Среди изученных образцов фасоли сцепления между генами *Co-1⁴* и *Phg-1* не установлено. Фрагменты амплификации ДНК-образцов с праймером TGA отмечены у всех изученных исходных сортов и их мутантов. При анализе продуктов амплификации с праймером CV542014 искомого бэнда (450 п. н.) не обнаружено.

Для определения в геномах наличия гена *Co-2* использовали праймеры SQ4. Наличие гена *Co-2* отмечено у сорта Паланачка ранняя, всех его мутантов и у мутантов ТсМЛ3Б и ТсМЛ7.

Для определения наличия гена *Co-4* использовали праймеры SC08, SY20, для аллеля *Co-4* – праймеры SAS13, SBB14. Наличие гена *Co-4* по праймеру SC08 не отмечено у всех геномов изученных образцов, а по праймеру SY20 результаты имели много неспецифичных фрагментов, что не позволяет говорить о достоверности как наличия искомого бэндов, так и отсутствия данного гена. Наличие

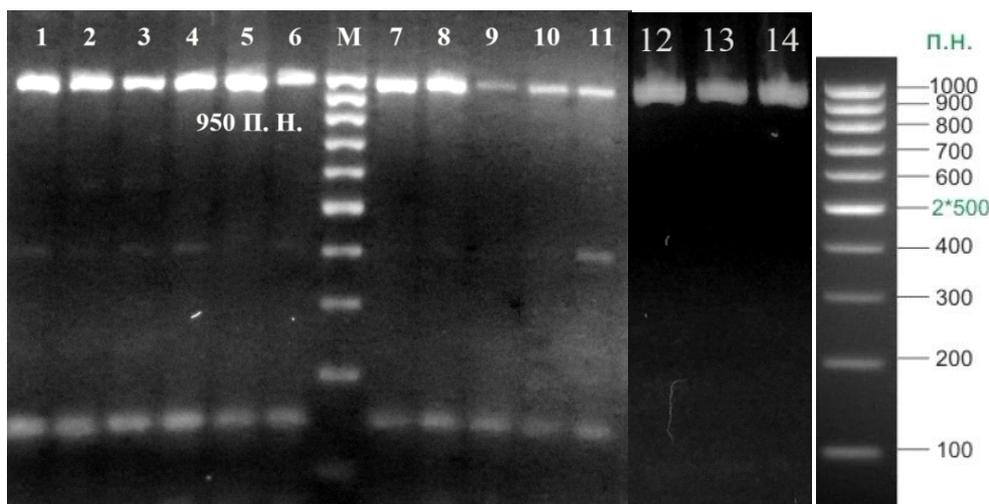


Рисунок 3 – Результаты типирования изученных образцов фасоли с праймером SAS13 (*Co-4²*): М – ДНК-маркер молекулярного веса 100bp «Праймтех»; 1 – Пр, сорт; 2 – Пр С1; 3 – Пр С2; 4 – Пр С3; 5 – ТсМЛ7; 6 – Тс 764 сорт; 7 – ТсМЛ3Б; 8 – ТсМЛ3О; 9 – Тс МЛ4; 10 – ТсМЛ6; 11 – С, сорт; 12 – СМЛ; 13 – ТсМЛ1; 14 – ТсМЛ2

Таблица 5 – Результаты оценки образцов фасоли обыкновенной по ДНК-маркированию, 2019 г.

Сорт	Ген (праймер)							
	<i>Co-1¹</i> (CV54 2014)	<i>Phg-1</i> (TGA)	<i>Co-2</i> (SQ4)	<i>Co-4²</i> (SAS13)	<i>Co-4</i> (SC08)	<i>Co-4²</i> (SBB14)	<i>Co-6</i> (SZ04)	<i>Co-6</i> (SZ20)
Пр	–	+	+	+	–	+	+	+
Пр С1	–	+	+	+	–	+	+	+
Пр С2	–	+	+	+	–	+	+	+
Пр С3	–	+	+	+	–	+	+	+
С	–	+	–	+	–	+	+	+
СМЛ	–	+	–	+	–	+	+	+
Тс	–	+	–	+	–	+	+	+
ТсМЗЛЗБ	–	+	+	+	–	+	+	+
ТсМЗЛЗО	–	+	–	+	–	+	+	+
ТсМЗЛ4	–	+	–	+	–	+	+	+
ТсМЗЛ6	–	+	–	+	–	+	+	+
ТсМЛ1	–	+	–	+	–	+	+	+
ТсМЛ2	–	+	–	+	–	+	+	+
ТсМЛ7	–	+	+	+	–	+	+	+

Примечание. «+» – наличие искомого бэнда, «-» – отсутствие искомого бэнда.

аллеля *Co-4²* подтверждено для всех геномов изученных образцов. При использовании двух праймеров SZ04 и SZ20 к гену *Co-6* у всех изученных образцов, (исходных сортов и их мутантов) установлено наличие фрагментов амплификации ДНК с длинами 567 и 845 п. н. к каждому праймеру соответственно.

Высокая выживаемость растений отмечена у мутантных семей Паланачки ранней – Пр С1, Пр С2, Пр С3 и мутантных линий сортов Секунда и Триумф сахарный 764 – СМЛ, ТсМЛЗБ, ТсМЛ4, ТсМЛ7. Из них высокий балл устойчивости был у мутантов Триумфа сахарного 764: ТсМЛЗО (7), ТсМЛ4 (7), ТсМЛ2 (7) и мутантной линии сорта Секунда СМЛ. Максимальное количество (4) из изученных генов антракнозостойчивости отмечено в геномах у сорта Паланачка ранняя, всех его мутантов и мутантных линий ТсМЛЗБ, ТсМЛ7. Остальные изученные мутантные образцы имели три гена антракнозостойчивости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комплексный анализ качественных и количественных признаков у изученных сортов и мутантов фасоли свидетельствует о значительной изменчивости селекционно ценных признаков у сортов и их мутантов по годам. В результате отбора в ряду мутантных поколений выделены формы со стабильным проявлением показателей продуктивности растений, их фенотипической характеристики, белковых спектров и ДНК-маркирования.

Среди полученных мутантных линий фасоли обыкновенной впервые в Республике Беларусь выделены: источники высокой продуктивности, устойчивости к антракнозу (линия СМЛ, ТсМЛЗО, ТсМЛ4, ТсМЛ2, ТсМЛ7),

содержащие в геноме максимальные количество (4) из изученных генов антракнозостойчивости (сорт Паланачка ранняя, мутант Пр С1, Пр С2, Пр С3 и мутантные линии у сорта Триумф сахарный 764 ТсМЛЗБ, ТсМЛ7); формы с измененной окраской семян (ТсМЛЗБ, ТсМЛЗО, ТсМЛ4, ТсМЛ6, ТсМЛ1, ТсМЛ2, ТсМЛ7), элементами продуктивности растений (Пр С1, ТсМЛЗБ, ТсМЛЗО, ТсМЛ4, ТсМЛ6, ТсМЛ1, ТсМЛ2, ТсМЛ7). Впервые показано влияние мутагенного воздействия на изменение величины и направления корреляционных связей между мерными признаками у мутантов в сравнении с исходным сортом.

По фенотипической характеристике растений у изученных перспективных линий не было отмечено случаев заболевания антракнозом за три года эксперимента. Оценку образцов на провокационном фоне не проводили в связи со статусом учебного ботанического сада БГУ, где выращивали растения.

Впервые установлены оригинальные (редкие) компоненты спектра запасных белков, которые могут служить маркерами при паспортизации форм и защите авторских прав по этими генотипам.

Комплексная оценка устойчивости растений по выживаемости в поле, заболеваемости проростков при воздействии патогена и ДНК-маркирование геномов позволяют более точно отобрать устойчивые к антракнозу генотипы. В то же время выявленные различия при разных способах оценки устойчивости изученных образцов могут быть следствием быстрой эволюции патогена и появления его новых изолятов, а также ограниченности изученных нами генов (из известных более 40), хотя не всегда количество присутствия генов в геноме определяет высокую устойчивость растений к антракнозу.

Список использованных источников

1. Сачивко, Т. В. Оценка новых сортов фасоли овощной по основным хозяйственно полезным признакам / Т. В. Сачивко // Вестн. Белорус. гос. с.-х. акад. – 2017. – № 1. – С. 48–51.

2. Перспективная ресурсосберегающая технология производства фасоли : метод. рекомендации / А. С. Акулов [и др.]. – М. : ФГНУ «Росин-формагротех», 2010. – 36 с.

3. Буравцева, Т. В. Паспортная база данных коллекции фасоли ВИР как инструмент систематизации генетического разнообразия, изучения истории коллекции и мониторинга мировой селекции культуры (обзор) / Т. В. Буравцева, Г. П. Егорова, М. А. Вишнякова // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2018. – № 179 (4). – С. 164–176. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2018-4-164-176>.

4. Источники высокого содержания белка семян фасоли обыкновенной (*Phaseolus vulgaris*) из мировой коллекции ВИР / Г. П. Егорова [и др.] // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2019. – № 180 (2). – С. 44–50. <https://doi.org/10.30901/2227-8834-2019-2-44-50>.

5. Стратегия и тактика мобилизации генетических ресурсов зернобобовых в коллекцию ВИР на рубеже XX–XXI веков / М. А. Вишнякова

[и др.] // Тр. по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 2012. – Т. 169. – С. 41–52.

6. Чайковский, А. И. Фасоль спаржевая в Беларуси / А. И. Чайковский, А. А. Аутко, Г. П. Янковская. – Минск : [б. и.], 2009. – 168 с.

7. Генофонд и селекция зерновых бобовых культур (люпин, вика, соя, фасоль) / Б. С. Курлович [и др.] // Теоретические основы селекции растений. – СПб. : ВНИИР, 1995. – Т. 3. – 438 с.

8. Дебелый, Г. А. Зернобобовые культуры в Нечерноземной зоне РФ / Г. А. Дебелый. – М. : Нимчиновка НИАЕХ ЦРНЗЦ, 2009. – 200 с.

9. Чайковский, А. И. Выращиваем фасоль овощную в рассадной культуре / А. И. Чайковский // Земледелие и растениеводство. – 2010. – № 5. – С. 31–33.

10. Казыдуб, Н. Г. Перспективы и результаты селекции фасоли в Омском ГАУ им. П. А. Столыпина / Н. Г. Казыдуб, Т. В. Маракаева, С. П. Кузьмина // Тр. Кубанского гос. аграр. ун-та. – 2015. – № 4 (55). – С. 94–100.

11. Пивоваров, В. Д. Основные направления и результаты селекции и семеноводства овощных бобовых культур во ВНИИССОК / В. Д. Пивоваров, Е. П. Пронина // Овощи России. – 2013. – № 1. – С. 4–11. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2013-1-4-11>.

12. Конарев, В. Г. Белки растений как генетические маркеры / В. Г. Конарев. – М. : Колос, 1983. – С. 125–177.

13. Егги, Э. Э. Электрофорез белков семян для сортовой идентификации высокополиморфных культур на примере козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.) / Э. Э. Егги // Аграр. Россия. – 2015. – № 11. – С. 14–20.

14. Губарева, Н. К. Идентификация сортов сельскохозяйственных культур по электрофоретическим спектрам запасных белков / Н. К. Губарева, И. П. Гаврилюк, А. В. Конарев // Аграр. Россия. – 2015. – № 11. – С. 21–27.

15. Genomic Analysis of Storage Protein Deficiency in Genetically Related Lines of Common Bean (*Phaseolus vulgaris*) / Sudhakar Pandurangan [et al.]. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00389>.

16. The Common Bean Genome / A. M. Gonzalez [et al.] // Springer, Cham, 2017. – P. 69–107.

17. Linkage mapping of the *Phg-1* and *Co-1⁴* genes for resistance to angular leaf spot and anthracnose in the common bean cultivar AND277 / M. C. Goncalves-Vidigal [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 2011. – Vol. 122. – P. 893–903.

18. SQ4 SCAR marker linked to the *Co-2* gene on B11 appears to be linked to the Ur 11f gene / H. S. Awale [et al.] // Annu. Report Bean Improv. Coop. – 2008. – Vol. 51. – P. 174–175.

19. Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6* / V. T. Queiroz [et al.] // Annu. Report Bean Improv. Coop. – 2004. – Vol. 47. – P. 249–250.

20. Marker – assisted dissection of the oligogenic anthracnose resistance in the common bean cultivar «G2333» / R. A. Yong [et al.] // Theor. Appl. Genet. – 1998. – Vol. 96. – P. 87–94.

21. Awale, H. E. Development of SCAR markers linked to *Co-4²* gene in common bean / H. E. Awale, J. D. Kelly // Annu. Report. Bean Improv. Coop. – 2001. – Vol. 44. – P. 119–120.
22. Цыганок, Н. С. О гибридизации в практической селекции овощных сортов гороха и фасоли: ретроспектива и перспектива / Н. С. Цыганок // Сельскохозяйственная биология. – 2014. – № 1. – С. 26–30.
23. Деревщюков, С. Н. История и результаты селекции фасоли овощной на Воронежской овощной опытной станции / С. Н. Деревщюков // Овощи России. – 2013. – № 1. – С. 55–59. <https://doi.org/10.18619/2072-9146-2013-1-55-59>.
24. Гирилович, И. С. Памятник природы республиканского значения «Дубрава» / И. С. Гирилович, М. А. Джус. – Минск : БГУ, 2009. – 93 с.
25. Коллекция мировых генетических ресурсов зерновых бобовых ВИР: пополнение, сохранение и изучение : метод. указания / М. А. Вишнякова [и др.] ; под ред. М. А. Вишняковой. – СПб. : ВИР, 2010. – 141 с.
26. Коллекция мировых генетических ресурсов зерновых бобовых ВИР: пополнение, сохранение и изучение : метод. указания / М. А. Вишнякова [и др.] ; под ред. М. А. Вишняковой. – 2-е изд., перераб. и доп. – СПб. : ВИР, 2018. – 143 с.
27. Идентификация сортов и регистрация генофонда культурных растений по белкам семян / В. Г. Конарев [и др.] ; под ред. В. Г. Конарева. – СПб. : ВИР, 2000. – С. 98–110.
28. Егги, Э. Э. Идентификация сортов Люпина узколистного (*Lupinus angustifolius* L.) с использованием электрофоретического спектра полипептидов белков семян : метод. указания / Э. Э. Егги ; Рос. акад. с.-х. наук, Всерос. науч.-исслед. ин-т растениеводства им. Н. И. Вавилова. – СПб. : ГНУ ВИР Россельхозакадемии, 2013. – 26 с.
29. Эsmet Berber. Characterization of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivars grown in turkey by SDS-page of seed proteins / Эsmet Berber, Fikret Yacar // Pak. J. Bot. – 2011. – № 43 (2). – P. 1085–1090.
30. Широкий унифицированный классификатор СЭВ и международный классификатор СЭВ культурных видов рода *Phaseolus* L. / Науч.-техн. совет стран – членов СЭВ по кол. диким и культур. видов растений и др. – Л. : ВИР, 1984. – 37 с.
31. Филимонова, Ю. А. Биологические особенности и продуктивность сортов фасоли (*Phaseolus vulgaris* L.) овощного использования из коллекции ВИР в условиях Краснодарского края : автореф. дис. ... канд. с.-х. наук : 06.01.05 / Ю. А. Филимонова ; Всерос. науч.-исслед. ин-т растениеводства им. Н. И. Вавилова РАСХН. – СПб., 2009. – 22 с.

Поступила в редакцию 16 декабря 2020 г.

**Yuting Xiao, I. B. Sauk, A. I. Chaykovskiy, E. S. Dosina-Dubeshko,
V. S. Anohina**

**VARIETIES AND MUTANT LINES EVALUATION OF GARDEN
BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) BY SELECTIONALLY
SIGNIFICANT CHARACTERISTICS**

SUMMARY

*The results of a three-year comparative assessment of promising mutant lines of different generations and their initial varieties of garden bean (*Phaseolus vulgaris* L.) created at the Belarusian State University by a complex of valuable breeding traits in field and laboratory conditions are presented. The biometric parameters of plants were studied: survival, elements of seed productivity and their correlations. The influence of the year of plant cultivation, the genotype of the variety and the mutant on the variability of traits is noted. For individual samples, rare components of the spectra of storage proteins, as well as different reactions of genotypes in the incidence of seedlings when exposed to seeds of a spore suspension of *Colletotrichum lindemuthianum*, were established. The results of DNA labeling of genomes of experimental forms for 4 genes (*Co-14*, *Co-2*, *Co-4*, *Co-6* and their alleles), which determine plant resistance to anthracnose, are presented.*

Key words: anthracnose, genotype, DNA-marker, seedling, storage protein, garden bean.