

## ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА СЕМЯН АБИССИНСКОГО ГОРОХА

**С.В. БОБКОВ**, кандидат сельскохозяйственных наук,

E-mail: svbobkov@gmail.com, <http://orcid.org/0000-0002-8146-0791>

**У.И. ОНУЧИНА**, E-mail: uliania21@yandex.ru, <http://orcid.org/0009-0001-3829-4513>

ФГБНУ ФНЦ ЗЕРНОБОБОВЫХ И КРУПЯНЫХ КУЛЬТУР

**Аннотация.** Изучено содержание белка и проведен электрофоретический анализ белков семян у образцов абиссинского гороха к-2759, к-9932 и сортов посевного гороха Гамбит и Ягуар. Образцы абиссинского гороха характеризовались высоким содержанием белка, наличием оригинальных изоформ легумина и высокой долей в белковом комплексе непроцессированного вицилина.

**Ключевые слова:** горох посевной, горох абиссинский, белок, запасной белок, конвицилин, вицилин, легумин.

**Для цитирования:** Бобков С.В., Онучина У.И. Характеристика белкового комплекса семян абиссинского гороха. *Зернобобовые и крупяные культуры*. 2024; 4(52):5-12. DOI: 10.24412/2309-348X-2024-4-5-12

## CHARACTERISTICS OF PROTEIN COMPLEX OF ABYSSINIAN PEA SEEDS

**S.V. Bobkov, U.I. Onuchina**

FSBSI FEDERAL SCIENTIFIC CENTER OF LEGUMES AND GROAT CROPS

**Abstract:** Protein content and electrophoretic analysis of seed proteins of Abyssinian pea samples k-2759, k-9932 and field pea varieties Gambit and Jaguar were studied. Abyssinian pea samples were characterized by high protein content, the presence of original legumin isoforms and a high proportion of non-processed vicilin in the protein complex.

**Keywords:** field pea, Abyssinian pea, protein, spare protein, convicilin, vicilin, lehumin.

### Введение

Успешная селекционная работа строится на использовании генетического разнообразия исходного материала. При этом, чем дальше эволюционное расстояние между посевным горохом и представителями других таксонов, тем выше полиморфизм вариантов генов, необходимый для успешного отбора растений с высокой семенной продуктивностью.

Представители различных таксонов рода гороха *Pisum* L. можно рассматривать в качестве потенциальных источников генов хозяйственно ценных признаков, ранее не вовлеченных в селекционный процесс. Гибридизация между представителями различных таксонов является мощным инструментом комбинирования генетического материала для успешного отбора. Молекулярные исследования выявили следы гибридизации между представителями различных таксонов (Weeden, 2018). Гибриды, полученные в результате отдаленных скрещиваний, могут обладать достаточным полиморфизмом вариантов генов для эффективного отбора на устойчивость к экстремальным условиям среды и патогенам, в конечном счете - на высокую семенную продуктивность.

Из литературных источников известно, что дикий вид красно-желтого гороха (*Pisum fulvum* Sibth. et Smith.) является источником генов устойчивости к абиотическим стрессорам, аскохитозу, мучнистой росе, ржавчине, заразихе и гороховой зерновке, а также источником аллелей нетрадиционных изоформ запасных белков [1, 2, 3]. Внутривидовые таксоны гороха

(*Pisum sativum* L.): ssp. *elatius*, *asiaticum*, *syriacum*, *transcaucasicum* и *abyssinicum* (классификация Макашевой Р.Х., 1979) менее изучены, но также являются ценным источником генетических вариантов, влияющих на агрономические признаки [4, 5].

Абиссинский горох является обособленным таксоном неопределенного происхождения и не имеет диких форм [6, 7, 8]. По классификации Р.Х. Макашевой (1979) абиссинский горох является подвидом (*abyssinicum*) вида гороха *Pisum sativum* L. Она не указывала разновидностей, но по окраске оболочки семян выделила три подразновидности: subvar. *abyssinicum* (фиолетово-красчатая окраска семян), subvar. *vavilovianum* (темнофиолетовая) и subvar. *viridulogriseum* (зеленовато-сероватая) (цит. по [5]). По общему габитусу абиссинский горох напоминает горох посевной, а отличается от гороха посевного зубчатыми листочками и глянцевой семенной оболочкой. Абиссинский горох культивируют в Йемене и Эфиопии вместе с горохом посевным (*Pisum sativum* L. ssp. *sativum*).

Абиссинский горох в сравнении с красно-желтым горохом исследован с меньшей интенсивностью. Однако он может представлять практический интерес для селекционеров благодаря своей скороспелости и устойчивости к бактериальной гнили, вызываемой *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* (без специфичности к расе паразита) [6], а также в качестве компонента скрещиваний для увеличения генетического разнообразия гороха посевного, необходимого для увеличения эффективности отбора отдаленных гибридов на высокую семенную продуктивность. Исследование различий в белковом комплексе позволит определить направления использования абиссинского гороха в селекционном процессе.

**Цель исследования** – изучение содержания белка в семядолях абиссинского гороха, электрофоретического изучения компонентного состава запасных белков для поиска и использования в селекции на качество нетрадиционных изоформ запасных белков.

#### **Материал и методика исследования**

Для электрофоретического анализа белков использовали семена образцов абиссинского гороха (*Pisum sativum* L. ssp. *abyssinicum*) к-2759 (рис. 1) и к-9932 коллекции ВИР, а также сорта гороха посевного (*P. sativum* L. ssp. *sativum*) Гамбит и Ягуар.



Рис. 1. А – взрослое растение (слева) образца к-2759 абиссинского гороха (*Pisum sativum* L. ssp. *abyssinicum*) коллекции ВИР в сравнении с растением посевного гороха сорта Саламанка, Б – семена образца к-2759

Для получения муки семена сои, абиссинского и посевного гороха разрушали с помощью молотка, отделяли и удаляли семенные оболочки. Фрагменты семядолей растирали в муку с помощью фарфоровых ступки и пестика.

Содержание белка определяли в муке, полученной из изолированных семядолей, по методу Кьельдаля с использованием дигестора DK 8 и аппарата UDK 152 производства Velp Scientifica (Италия). Коэффициент перевода общего азота в белок равнялся 6,25.

Белки для электрофоретического анализа экстрагировали из муки изолированных семядолей индивидуальных семян абиссинского и посевного гороха и сои сорта Ланцетная. Для установления различий между абиссинским и посевным горохом по компонентному составу белковых спектров дополнительно проводили экстракцию белков в смесях муки образцов (к-9932+к-2759) и сортов (Ягуар+Гамбит).

Для экстракции брали 2,7 мг муки индивидуальных семян и помещали в ячейки микро-титр планшетки. Экстракцию запасных белков проводили с использованием ТРИС-глицинового буфера (ТРИС, лицин, додецилсульфат натрия, pH=8,8) в течении 20 часов при температуре 4°C.

Десять микролитров экстракта смешивали с равным объемом буфера нанесения (ТРИС-HCl, глицерин, додецилсульфат натрия,  $\beta$ -меркаптоэтанол, бромфеноловый синий). Затем 10 микролитров полученной смеси помещали в заполненные буфером ячейки 5% концентрирующего геля в камере для вертикального электрофореза VE-4 (Хеликон, Россия). Разделение белков происходило в 12% геле.

Локализацию запасных белков конвицилина, непроцессированного вицилина и  $\alpha$ -субъединицы легумина на электрофоретических пластинах определяли с использованием набора маркеров с молекулярной массой 6,5-200 кДа (Sigma-Aldrich, США). Содержание указанных белков в компонентах электрофоретических спектров определяли денситометрическим методом. Нормализацию содержания  $\alpha$ -субъединицы белка легумина проводили на общее содержание белка в электрофоретическом спектре. Статистическую обработку данных проводили с использованием описательных статистик и однофакторного дисперсионного анализа. Коррекцию статистической значимости на множественные сравнения средних проводили с использованием HSD Тьюки.

#### **Результаты исследований**

Высокое содержание белка является важной характеристикой для использования в селекции на высокое качество зерна. Накопление белка, преимущественно, происходит в семядолях семян гороха. Признаки «толщина семенных оболочек» и «содержание белка в семядолях» контролируются различными генами. Поэтому информацию о содержании белка в семядолях гороха можно рассматривать как более ценную в сравнении с его содержанием в целом семени. Учитывая, что абиссинский горох, как и горох посевной характеризуется тонкими семенными оболочками [5, 8], полученные данные о различиях в содержании белка в семядолях можно экстраполировать на привычное содержание белка в целых семенах.

Дисперсионный анализ выявил существенные различия по содержанию белка в изолированных семядолях образцов абиссинского и сортов посевного гороха с выраженным размером эффекта ( $F(3,41)=14,633$ ;  $p<0,001$ ;  $\eta^2=0,517$ ). В таблице 1 приведены данные о высоком в сравнении с сортами содержании белка в семядолях абиссинского гороха.

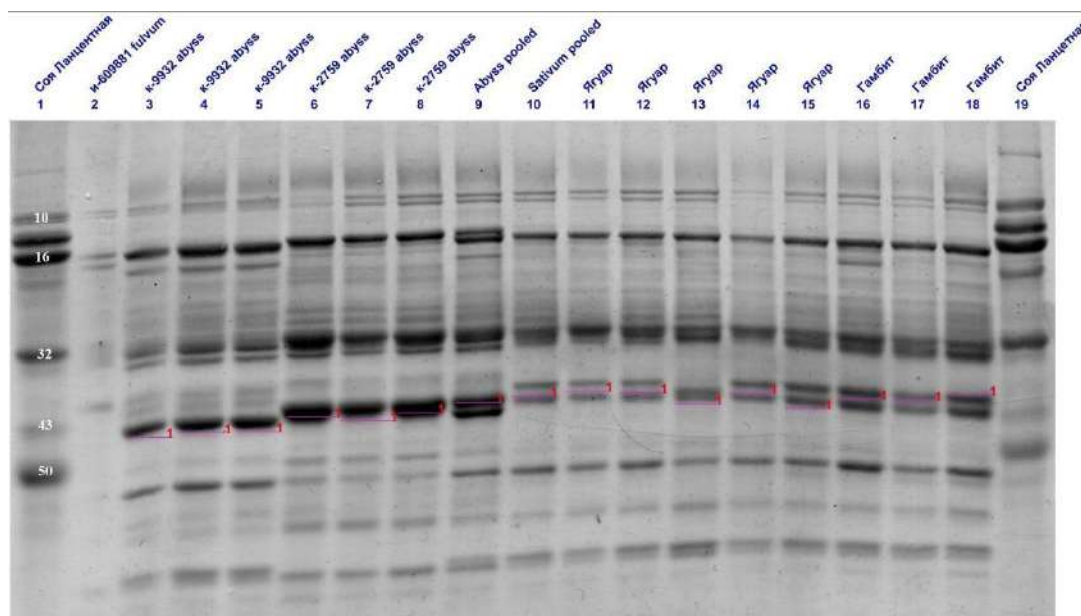
По содержанию белка в семядолях образец к-9932 существенно ( $p<0,001$ ) превышал сорт Ягуар на 6,5%, а сорт Гамбит - на 5,8%. Образец к-2759 по содержанию белка статистически значимо превышал сорта Ягуар ( $p=0,003$ ) и Гамбит ( $p=0,019$ ) на 4,2% и 3,5% соответственно.

Проводили анализ компонентного состава белков как индивидуальных семян (изолированных семядолей) абиссинского и посевного гороха, так и смеси муки образцов абиссинского гороха (к-9932+к-2759) и сортов посевного гороха (Ягуар+Гамбит). Применение смеси муки позволяет провести более тонкие различия между абиссинским и посевным горохом, не обращая внимания на полиморфизм между отдельными образцами и сортами.

**Содержание белка в семенах образцов абиссинского и сортов посевного гороха, урожай семян 2023 г.**

Образец, сорт	Среднее содержание белка, %	95% доверительный интервал	
		нижняя граница	верхняя граница
к-2759	30,5±0,8	28,8	32,1
к-9932	32,8±0,8	31,1	34,4
Ягуар	26,3±0,8	24,8	27,9
Гамбит	27,0±0,8	25,4	28,6
<i>Существенные различия по содержанию белка</i>			
Сравниваемые пары	Разница в содержании белка, %	p-value	
к-9932 минус Ягуар	+6,5	<0,001	
к-9932 минус Гамбит	+5,8	<0,001	
к-2759 минус Ягуар	+4,2	0,003	
к-9932 минус Гамбит	+3,5	0,019	

Электрофоретический анализ белков семян смеси муки абиссинского и посевного гороха выявил 39 позиций размещения компонентов, среди них 13 (33,3%) были полиморфными, 7 (17,9%) по наличию-отсутствию и 6 (15,4%) по интенсивности окрашивания (рис. 2).



*Рис. 2. Электрофоретические спектры белков семян абиссинского и посевного гороха. На первой дорожке приведена нумерация реперных компонентов спектра сои (сорт Ланцетная). Цифрой 1 на электрофоретическом геле обозначены изоформы  $\alpha$ -субъединицы легумина*

В электрофоретическом спектре из смеси белков 2 образцов абиссинского гороха (спектр 9) в области 16 позиции по шкале соевого спектра (рис. 2) обнаружены 2 белковых компонента, нижний компонент образца к-9932, а верхний - образца к-2759. Наличие двух компонентов свидетельствовало о наличии полиморфизма по изоформам конвицилина у образцов абиссинского гороха. При этом, у сортов Ягуар и Гамбит полиморфизм по изоформам конвицилина не наблюдался.

В области 32 компонента соевой шкалы (рис. 2) у абиссинского и посевного гороха локализованы белковые компоненты непроцессированного вицилина. У абиссинского гороха компоненты конвицилина были более компактными и содержали больше белка в сравнении с компонентами посевного гороха.

В области 43 компонента по соевой шкале располагались компоненты  $\alpha$ -субъединицы легумина. В электрофоретических спектрах посевного гороха явно присутствовали 2 изоформы указанного белка, как у индивидуальных семян, так и в смешанном образце (рис. 2, спектр 10). Спектры  $\alpha$ -субъединицы легумина каждого из образцов абиссинского гороха состояли из одного компонента. Возможно, в компонентах присутствовало более 2 белков, но из-за высокой наполненности компонентов белком их нельзя было дифференцировать. Электрофоретический анализ индивидуальных семян показал, что в образцах абиссинского гороха к-9932 и к-2759 присутствовали различные изоформы  $\alpha$ -субъединицы легумина. Соответственно, в спектре смешанного образца (рис. 2, спектр 9) абиссинского гороха (к-9932+к-2759) присутствовали 2 компонента  $\alpha$ -субъединицы легумина, верхний образца к-2759 и нижний образца к-9932 (рис. 2). Присутствие в спектрах посевного гороха 2 изоформ  $\alpha$ -субъединицы легумина является индикатором экспрессии 2 различных генов, кодирующих запасной белок легумин. Следует обратить внимание, что в спектре номер 13 сорта Ягуар присутствовал только 1 компонент (изоформа)  $\alpha$ -субъединицы легумина.

Использование шкалы маркеров 94,7; 66, 55 и 45 кДа из стандартного набора Sigma-Aldrich позволило определить молекулярную массу компонентов (изоформ)  $\alpha$ -субъединицы легумина в спектрах из смешанных белков семян образцов к-9932, к-2759 (на рисунке 2 обозначен как Abyss pooled) и сортов Ягуар и Гамбит (Sativum pooled) (табл. 2).

Таблица 2

**Молекулярная масса изоформ  $\alpha$ -субъединицы легумина у абиссинского и посевного гороха, кДа**

Компонент $\alpha$ -субъединицы легумина в спектре 9	Номер дорожки электрофоретического спектра на рис. 1		Компонент $\alpha$ -субъединицы легумина в спектре 10
	9 (к-9932+к-2759)	10 (Ягуар+Гамбит)	
		48,9	1
1	47,2	46,7	2
2	45,6		

Результаты анализа показали, что в смешанном спектре абиссинского гороха присутствовали 2 изоформы указанного белка с молекулярными массами 47,2 и 45,6 кДа. Изоформа с молекулярной массой 47,2 кДа принадлежала образцу к-2759, а изоформа 45,6 кДа – образцу к-9932. В смешанном образце и, соответственно, в белках индивидуальных семян посевного гороха присутствовали 2 изоформы  $\alpha$ -субъединицы легумина с молекулярными массами 48,9 и 46,7 кДа. При этом одно из семян сорта Ягуар (рис. 2, спектр 13) содержало 1 изоформу  $\alpha$ -субъединицы легумина с молекулярной массой 46,7 кДа. Следует обратить внимание, что изоформа  $\alpha$ -субъединицы легумина образца к-2759 и нижняя изоформа сортов Ягуар и Гамбит имели близкую молекулярную массу 47,2 кДа и 46,7 кДа, что может указывать на гомологию локусов, кодирующих указанный белок.

Основными запасными белками гороха являются конвицилин, вицилин и легумин [9]. Конвицилин не подвергается посттрансляционному процессингу, вицилин может быть процессированным и непроцессированным, а молекула легумина разделяется на две субъединицы,  $\alpha$  и  $\beta$ . Для определения соотношения запасных белков в семенах гороха выбрали конвицилин, непроцессированный вицилин и  $\alpha$ -субъединицу легумина, находящихся в компонентах с наиболее интенсивными компонентами электрофоретических спектров (рис. 2). На рисунке 2 компоненты конвицилина гороха располагались напротив 16 компонентов

спектра сои, компоненты непроцессированного вицилиан в районе 32, а компоненты α-субъединицы легумина – напротив 43 компонента сои.

Результаты анализа показали, что сорта посевного и образцы абиссинского гороха различались между собой по доле запасных наиболее многочисленных запасных белков: конвицилина, непроцессированного вицилина и α-субъединицы легумина (рис. 3).

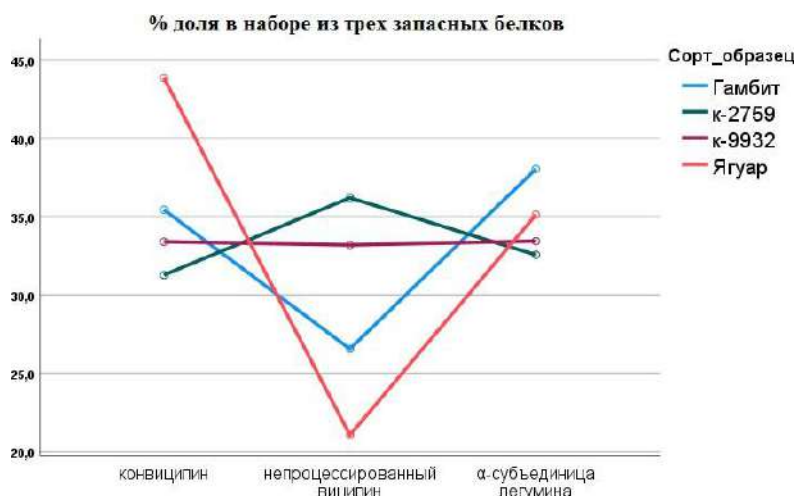


Рис. 3. Доля наиболее многочисленных запасных белков в семенах сортов посевного и образцов абиссинского гороха

Процентная доля конвицилина от суммарного содержания конвицилина, непроцессированного вицилина и α-субъединицы легумина варьировала от 31,3% (к-2759) до 43,9% (Ягуар). Доля непроцессированного вицилина изменялась от 21,0 % (Ягуар) до 38,0% (Гамбит), а доля и α-субъединицы легумина – от 32,6 (к-2759) до 38, 0% (Гамбит) (табл. 3).

Таблица 3

**Процентная доля белка в наборе из трех запасных белков: конвицилина, непроцессированного вицилина и α-субъединицы легумина**

Образец, сорт	Доля белка, %	95% доверительный интервал	
		нижняя граница	верхняя граница
<i>Конвицилин</i>			
к-2759	31,3±3,7	23,740	38,781
к-9932	33,4±3,7	25,871	40,911
Ягуар	43,9±2,9	38,024	49,675
Гамбит	35,4±3,7	27,907	42,948
<i>Непроцессированный вицилин</i>			
к-2759	36,2±3,7	28,668	43,709
к-9932	33,2±3,7	25,660	40,701
Ягуар	21,0±2,9	15,213	26,864
Гамбит	26,5±3,7	19,018	34,059
<i>α-субъединица легумина</i>			
к-2759	32,6±3,7	25,031	40,072
к-9932	33,4±3,7	25,908	40,949
Ягуар	35,1±2,9	29,286	40,937
Гамбит	38,0±3,7	30,513	45,554
<i>Существенные различия по доле белка</i>			
Сравниваемые пары	Разница в доле белка, %	HSD Тьюки, p-value	
<i>Непроцессированный вицилин</i>			
к-2759 минус Ягуар	15,2	0,027	
к-9932 минус Ягуар	12,2	0,043	
к-9932 минус Гамбит	6,7	0,045	



Дисперсионный анализ не выявил существенных различий по доле конвицилина в наборе из 3 основных белков ( $F(3,10)=3,49$ ;  $p=0,058$ ;  $\eta^2=0,511$ ). По процентной доле конвицилина сорт Ягуар значительно, но статистически не значимо превышал образцы к-2759, к-9932 и сорт Гамбит на 12,6%; 10,5% и 8,4% (HSD Тьюки,  $p=0,068$ ; 0,145 и 0,282 соответственно).

По доле непроцессированного вицилина дисперсионный анализ выявил существенные различия между сортами и образцами гороха ( $F(3,10)=9,5$ ;  $p=0,016$ ;  $\eta^2=0,704$ ). Доля непроцессированного вицилина у образца абиссинского гороха к-2759 существенно (на 15,1%) превышала долю указанного белка у сорта Ягуар, а образец к-9932 по доле непроцессированного вицилина существенно превышал сорта гороха посевного Ягуар и Гамбит на 12,1 и 6,6% соответственно (табл. 3).

Дисперсионный анализ не выявил существенных различий между сортами и образцами абиссинского гороха по процентной доле  $\alpha$ -субъединицы легумина ( $F(3,10)=0,276$ ;  $p=0,841$ ;  $\eta^2=0,0077$ ).

### Заключение

Изучено содержание белка и проведен электрофоретический анализ белков семян у образцов абиссинского гороха к-2759, к-9932 и сортов посевного гороха Гамбит и Ягуар. Образцы абиссинского гороха по содержанию белка в семядолях существенно превышали сорта на 3,5-6,5 %. Электрофоретический анализ выявил у абиссинского гороха к-9932 и к-2759 отличные от посевного гороха изоформы  $\alpha$ -субъединицы легумина. Образцы абиссинского гороха существенно не отличаются от посевного гороха по процентной доле легумина, но характеризуются существенно более высокой долей непроцессированного вицилина.

***Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках Государственного задания ФГБНУ ФНЦ ЗБК по разделу FGZZ-2022-0003 "Физиолого-биохимическое изучение генетических ресурсов зернобобовых и крупяных культур для использования в селекционном процессе".***

### Литература

1. Fondevilla S, Torres AM, Moreno MT, Rubiales D. Identification of a new gene for resistance to powder mildew in *Pisum fulvum* a wild relative of pea. *Breed sci.* 2007;57(2):181-184. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.57.181>
2. Barilli E, Satovic Z, Rubiales D, Torres A. Mapping of quantitative trait loci controlling partial resistance against rust incited by *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. in a *Pisum fulvum* L. intraspecific cross. *Euphytica.* 2010. 175(2):151-159. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0141-z>
3. Бобков С.В., Бычков И.А., Селихова Т.Н., Семенова Е.В., Вишнякова М.А. Анализ интрогрессивных линий межвидовых гибридов гороха по компонентному составу белков семян // Экологическая генетика. – 2020. – Т. 18. – № 1. – С. 79-88. <https://doi.org/10.17816/e>
4. Hollaway G.J., Bretag T.W., Price T.V. The epidemiology and management of bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*) of field pea *Pisum sativum*) in Australia: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 2007. 58:86-1099. <http://dx.doi.org/10.1071/AR06384>
5. Костерин О.Э. Горох абиссинский (*Lathyrus schaeferi* Kosterin nom. nov. pro *Pisum abyssinicum* A. Br.) – проблематичный таксон // Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(2):158-169 DOI 10.18699/VJ17.234
6. Бобков С.В., Башкирова К.А. Содержание фотосинтетических пигментов в различных органах растений дикого и культурного гороха // Зернобобовые и крупяные культуры. – 2021. – № 4 (40). – С. 15-23.
7. Weeden, N. F. (2018). Domestication of Pea (*Pisum sativum* L.): The Case of the Abyssinian Pea. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00515>

8. O’Kane, F.E., Happe, R.P., Vereijken, J. M., Gruppen, H., & Van Boekel M.A.J.S. (2004) Characterization of pea vicilin. 2. Consequences of compositional heterogeneity on heat-induced gelation behavior. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3149-3154.

9. Tzitzikas E.N., Vincken J.P., Groot J., Gruppen H., & Visser R.G. (2006) Genetic variation in pea seed composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 425-433.

#### References

1. Fondevilla S, Torres AM, Moreno MT, Rubiales D. Identification of a new gene for resistance to powder mildew in *Pisum fulvum* a wild relative of pea. *Breed sci.* 2007;57(2):181-184. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.57.181>

2. Barilli E., Satovic Z., Rubiales D., Torres A. Mapping of quantitative trait loci controlling partial resistance against rust incited by *Uromyces pisi* (Pers.) Wint. in a *Pisum fulvum* L. intraspecific cross. *Euphytica*. 2010;175(2):151-159. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0141-z>

3. Bobkov S.V., Bychkov I.A., Selikhova T.N., Semenova E.V., Vishnyakova M.A. Analysis of introgressive lines of interspecific pea hybrids on the component composition of seed proteins. *Ekologicheskaya genetika*. 2020, Vol. 18, no 1, pp. 79-88. <https://doi.org/10.17816/e>

4. Hollaway G.J., Bretag T.W., Price T.V. The epidemiology and management of bacterial blight (*Pseudomonas syringae* pv. *pisi*) of field pea *Pisum sativum* in Australia: a review. *Aust. J. Agric. Res.* 2007;58:86-1099. <http://dx.doi.org/10.1071/AR06384>

5. Kosterin O.E. Abyssinian pea (*Lathyrus schaeferi* Kosterin nom. nov. pro *Pisum abyssinicum* A. Br.) is a problematic taxon. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii*. 2017;21(2):158-169 DOI 10.18699/VJ17.234 (In Russian)

6. Bobkov S.V., Bashkurova K.A. Photosynthetic pigment content in different organs of wild and cultivated pea plants. *Zernobobovye i krupyanye kul'tury*. 2021, no. 4 (40), pp. 15-23. (In Russian)

7. Weeden N. F. (2018). Domestication of Pea (*Pisum sativum* L.): The Case of the Abyssinian Pea. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00515>

8. O’Kane F.E., Happe R.P., Vereijken J. M., Gruppen H., & Van Boekel M.A.J.S. (2004) Characterization of pea vicilin. 2. Consequences of compositional heterogeneity on heat-induced gelation behavior. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3149-3154.

9. Tzitzikas E.N., Vincken J.P., Groot J., Gruppen H., & Visser R.G. (2006) Genetic variation in pea seed composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 425-433.