

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

УДК 575.224.46

doi: 10.26907/2542-064X.2022.3.378-391

ХИМИЧЕСКИЙ МУТАГЕНЕЗ *Triticum sinskajae* A. Filat. et Kurk. ПРИ ПОМОЩИ АЗИДА НАТРИЯ

А.Р. Кулуев, Б.Р. Кулуев, А.В. Чемерис

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН, г. Уфа, 450054, Россия

Аннотация

В настоящей работе изучен химический мутагенез *Triticum sinskajae*, индуцированный азидом натрия. Семена исследуемого вида пшеницы предварительно обрабатывали растворами азид натрия различной концентрации. Воздействие мутагена оценивали по морфометрическим характеристикам полученных растений в период вегетации и плодоношения. Генетический полиморфизм мутантных форм определяли с помощью ISSR-анализа. С учетом показателей всхожести семян и дальнейшего роста растений установлена эффективная концентрация азид натрия для обработки *T. sinskajae* – 0.1 мМ. Показано, что под влиянием азид натрия у растений возникали различные морфологические отклонения от нормы: в низких концентрациях он способствовал увеличению высоты стебля и колоса, а в высоких – приводил к их уменьшению. Существенных различий по длине листьев и по массе 1000 зерен между мутантами и диким типом не выявлено. Сделан вывод о том, что ISSR-анализ может быть использован в качестве диагностического подхода для оценки общего мутагенного воздействия химических реагентов на геном. По результатам проведенной работы отобраны 78 мутантных форм *T. sinskajae*, сохраняющих короткостебельность в ряду поколений.

Ключевые слова: *Triticum sinskajae*, мутация, азид натрия, ISSR-анализ, генетический полиморфизм, диплоидные пшеницы, селекция

Введение

Triticum sinskajae A. Filat. et Kurk (пшеница Синской) является дикорастущей диплоидной пшеницей, близкородственной таким видам, как *Triticum monocosmum* L., *Triticum boeoticum* Boiss. и *Triticum urartu* Thum. ex Gandil., из которых лишь первый культивируется, считаясь одним из наиболее древних одомашненных человеком растений [1]. Пшеница Синской, получившая свое название в честь известного российского тритиколога Е.Н. Синской, была обнаружена в начале 70-х годов XX в. при очередной репродукции на Среднеазиатской и Дагестанской станциях Всероссийского института генетических ресурсов растений имени Н.И. Вавилова (далее ВИР) образцов *T. monocosmum*, привезенных П.М. Жуковским еще в 1926 г. из Турции. Однако по своим признакам она значительно отличается от *T. monocosmum* и образует отдельный таксон видового ранга [2].

Взрослые растения данного вида достигают 120 см в высоту, отличаются большой кустистостью, а также имеют тонкую и полую соломинку. Стеблевые узлы короткие, зеленые, с бурой каймой снизу, опушены густыми короткими

волосками. По устойчивости к грибам она близка к *T. monococcum*, но морфологически отличается более мягкой колосковой чешуей, более крупными и короткими колосками, менее развитой остью (1–2.5 см) [2]. Это единственный легкообмолачиваемый вид диплоидных пшениц [3, 4], для которого отмечен наивысший показатель содержания белка среди однозернянок, в среднем составляющий 22% на сухую массу зерна [5], что свидетельствует о его уникальных свойствах.

Несмотря на широкое внедрение современных методов геномной инженерии и геномного редактирования в биотехнологию растений, создание новых сортов классическими методами не теряет актуальности. Основными методами селекции растений остаются индивидуальный и массовый отбор, а также гибридизация. Тем не менее генетический полиморфизм некоторых культурных растений недостаточен для проведения гибридизации и отбора. Эта проблема особенно актуальна в случае с *T. sinskajae*, у которой даже в мировой коллекции семян ВИР есть лишь одна линия – к-48993. В то же время имеются сведения о других формах данной пшеницы, характеризующихся, к примеру, высокой устойчивостью к полеганию и грибковым заболеваниям [6], однако эти формы недоступны для широкого круга исследователей. Генетическое разнообразие линий и сортов культурных растений можно также повысить с помощью индуцированного мутагенеза. Проще всего использовать для этого мутагенные химические вещества, среди которых наиболее популярны этилметансульфонат и азид натрия.

Азид натрия (NaN_3) – химический мутаген, широко и с успехом применяемый в селекции культурных растений для улучшения их свойств и приобретения ими новых признаков. Его влияние на генетический аппарат растений может способствовать повышению их устойчивости к неблагоприятным условиям окружающей среды и патогенам, что, в свою очередь, приводит к увеличению их урожайности и значений количественных признаков. Азид натрия чаще всего вызывает замену GC на AT или AT на GC, то есть транзицию [7]. При этом мутации чаще всего точечные, и, самое главное, они не сопровождаются сдвигом рамки считывания. Таким образом, синтезированный с измененной последовательностью аминокислот белок у мутантных растений может сохранять свои биологические свойства или же отличаться по функциям от белка обычных растений [8].

В литературе имеются сведения об обработке азидом натрия семян твердой [9] и мягкой пшеницы [10, 11] с целью получения мутантов. Пшеницы, подвергнутые воздействию азиды натрия, как правило, характеризовались укорочением длины стебля и замедлением роста [8]. Что касается диплоидных видов пшениц, в частности *T. sinskajae*, их химический мутагенез при помощи азиды натрия еще не проводился. В связи с этим целью настоящего исследования явилось индуцирование азидом натрия химического мутагенеза *T. sinskajae* с последующим подбором оптимальных концентраций данного мутагена, а также молекулярно-генетический анализ полученных растений для общей оценки мутагенного эффекта.

1. Материалы и методы

Объектом исследования в опытах по химическому мутагенезу послужила диплоидная пшеница *Triticum sinskajae* (линия к-48993, Дагестан). В молекулярно-генетических исследованиях использовались ближайшие родственники *T. sinskajae* – диплоидные пшеницы *T. boeoticum* (к-61666), *T. boeoticum* var. *thoudar* (к-40119),

T. boeoticum var. *larionowii* (к-59162), *T. monococcum* var. *vulgare* (к-39420), *T. monococcum* var. *monococcum* (к-17223, к-39420, к-39421, к-39422, к-65535, к-20400), *T. urartu* (к-58504, к-58496), а также *Aegilops tauschii* Coss. (к-285). Все семена были получены из мировой коллекции ВИР.

Химически индуцированный мутагенез проводили с помощью азид натрия (NaN_3), растворенного в Na-фосфатном буфере (рН 3) в концентрациях от 0.1 до 0.6 мМ. Все концентрации подбирались эмпирическим путем. Для этого предварительно были проведены опыты на семенах *T. sinskajae* с концентрациями азид натрия от 1 до 10 мМ при экспозиции в течение 4 ч, а затем с концентрациями азид натрия от 0.1 до 0.9 мМ при аналогичном времени экспозиции. Исходя из полученных данных, в ходе основного эксперимента семена инкубировали в мутагене в течение 4 ч, так как при увеличении этого времени их всхожесть резко падала. Контрольные семена обрабатывали фосфатным буфером (рН 3). Все семена проращивали в стерильных чашках Петри на фильтровальной бумаге при комнатной температуре. Для семян, обработанных азидом натрия в разных концентрациях, через 5 дней после начала опыта определяли лабораторную всхожесть, так как в последующие дни увеличения процента всхожести мы не наблюдали.

Для оценки мутагенного эффекта азид натрия измеряли следующие морфометрические параметры на стадии колошения и созревания семян у контрольных и опытных растений в 2018 и 2019 гг.: длину стебля и листьев, колоса, ости, число зерен в колосе и массу 1000 зерен.

В первый год исследования экспериментальным путем определяли оптимальную концентрацию азид натрия для эффективного мутагенеза *T. sinskajae*, а также вели фенологические наблюдения и измеряли морфометрические параметры полученных мутантных форм первого поколения M_1 (2018 г.). В контрольной группе обработка растений азидом натрия не проводилась (дикий тип). Контрольные ($n = 100$) и опытные растения M_1 ($n = 100$) высевали на опытном участке ИБГ УФИЦ РАН в пределах г. Уфы.

Во второй год исследования семян для опыта с азидом натрия бралось в два раза больше ($n = 200$), получены опытные растения M_1 (2019 г.). Кроме того, отобранные семена растений M_1 (2018 г.) использовались для посадки во второй год исследования, из них получены опытные растения второго поколения M_2 (2019 г.). Контрольные ($n = 200$) и опытные растения M_1 и M_2 ($n = 200$) высевали на земельном участке в пригороде г. Уфы.

Отсеивались больные, с сильными морфологическими отклонениями и не завязавшие семян растения. Отдельно измеряли растения низкого и высокого морфотипов как среди обработанных азидом натрия, так и среди контрольных растений.

Сумма активных температур (выше 10°C) за вегетационный период в 2018 г. составила 2145°C , в 2019 г. – 2082°C . При этом в 2018 г. было 11 дождливых дней, а в 2019 г. – 17 (по данным <https://www.gismeteo.ru/diary>).

По результатам исследований были построены гистограммы со средними значениями выборки. Барами обозначали стандартную ошибку среднего. Достоверность различий во всех экспериментах оценивали при помощи U -критерия Манна – Уитни.

Тотальную ДНК пшеницы выделяли из сухих листьев стандартным СТАВ-методом [12]. ISSR-анализ проводили с использованием праймеров ISSR-16, ISSR-24 и ISSR-33 [13]. Реакционная смесь для ISSR-анализа объемом 30 мкл содержала 1 ед. Таq-полимеразы (ЗАО «Евроген», Россия), 3 мкл 10-кратного буфера Таq-полимеразы, 5 мМ MgCl₂, 0.25 мкМ каждого dNTP, 90 пМ праймера, 0.1–0.2 мкг тотальной ДНК. Смесь покрывали 20 мкл минерального масла и проводили ПЦР-анализ при следующих условиях: начальная денатурация – 3 мин при 94 °С; 40 циклов: денатурация при 94 °С – 50 с, температура отжига 51 °С – 1 мин 10 с и элонгация при 72 °С 1 мин 30 с; заключительная элонгация 7 мин при 72 °С.

Для интерпретации данных ISSR-анализа результаты ПЦР-анализа записывали в виде матрицы бинарных признаков, в которой наличие или отсутствие одинаковых по размеру фрагментов в ISSR-спектрах рассматривались как состояние 1 или 0 соответственно. Дальнейшую количественную оценку степени полиморфизма и определение уровня дивергенции между видами и мутантными растениями проводили с помощью компьютерной программы Treecoon (версия 1.3b). Данная программа для построения дендрограмм сходства требует наличия внешнего близкого родственника (корневой вид), но из другого рода. Корневым видом мы выбрали *Aegilops tauschii* (к-285). По ISSR-спектрам методом ближайшего соседа (NJ) были построены дендрограммы, отражающие возможную степень генетического сходства исследуемого вида и других форм диплоидных пшениц. Достоверность построений оценивалась с помощью бутстреп-анализа (1000 итераций).

2. Результаты

Для мягкой пшеницы опыты с использованием химического мутагеза на основе азиды натрия проводят в концентрациях 1–10 мМ [10, 11]. Однако всхожесть семян пшеницы Синской в данном диапазоне концентраций при экспозиции в течение 4 ч оказалась нулевой (рис. 1). Поэтому было принято решение уменьшить концентрацию мутагена в наших опытах до 0.1–0.9 мМ. При концентрациях от 0.1 до 0.6 мМ наблюдалась различного уровня всхожесть, которая снижалась, если происходило превышение этих значений. При концентрациях от 0.7 до 0.9 мМ всхожесть также оказалась нулевой (рис. 1). После обработки 0.1 мМ азиды натрия всходило более половины всех семян, тогда как в контрольной группе показатели всхожести приближались к 100% (рис. 1).

При концентрации азиды натрия от 0.2 до 0.6 мМ всхожесть резко падала. Можно предположить, что оптимальным для обработки семян *T. sinskajae* является раствор азиды натрия в концентрации около 0.1 мМ, так как при этом всхожесть семян уменьшается примерно в 2 раза (ЛД₅₀). При этом негативное воздействие азиды натрия, складывающееся из его токсического и мутагенного эффектов, очевидно, хотя в то же время возможно получение довольно большого числа мутантных форм пшеницы Синской с его помощью.

В ходе наблюдений за популяцией *T. sinskajae*, семена которой в количестве 100 шт. были обработаны 0.1 мМ азиды натрия, выявлены, как и в случае с контрольными растениями, два морфологических типа, которые отличались длиной стебля и колоса: высокий (длинностебельный) и низкий (короткостебельный).

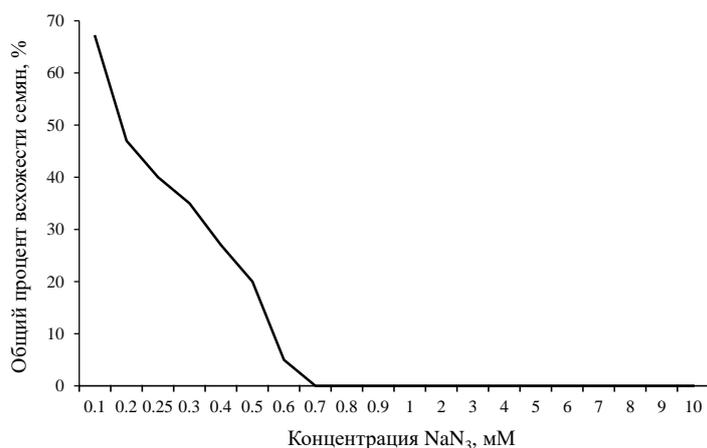


Рис. 1. График зависимости всхожести семян *T. sinskajae* от концентрации азид натрия

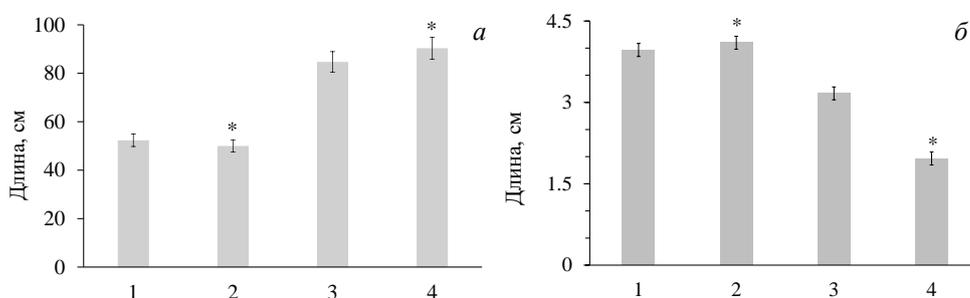


Рис. 2. Результаты морфометрического анализа растений M_1 (2018 г.) после проведенного мутагенеза. а) Длина стебля контрольных и опытных (мутантных) растений *T. sinskajae*: 1 – низкий морфотип (контроль), 2 – низкий морфотип (M_1), 3 – высокий морфотип (контроль), 4 – высокий морфотип (M_1). б) Длина колоса контрольных и опытных растений *T. sinskajae*: 1 – высокий морфотип (контроль), 2 – высокий морфотип (M_1), 3 – низкий морфотип (контроль), 4 – низкий морфотип (M_1). $n = 100$; * $p < 0.01$

При этом значения изучаемых признаков (длина стебля и колоса) в низком морфотипе были меньше на 40–43% по сравнению с высоким морфотипом.

По длине стебля в первый год исследования опытные растения M_1 (2018 г.) оказались короче контрольных только в случае низкого морфотипа (рис. 2, а). В среднем уменьшение составило 4% по сравнению с контрольной группой, в то время как высокий морфотип характеризовался увеличением на 7%. По длине колоса и высокому морфотипу у опытных растений M_1 наблюдалось лишь незначительное увеличение, в среднем на 3%, а по низкому морфотипу – уменьшение на 37% по сравнению с необработанными азидом натрия контрольными растениями (рис. 2, б). Все эти изменения были достоверно более значительными, чем те, которые фиксировались внутри каждой линии анализируемых растений.

У *T. sinskajae* на стебле имеется по два листа. Первый лист (флаговый) самый длинный, второй лист значительно короче. Следует отметить, что, по первому и второму листу не было различий в длине как внутри группы контрольных растений, так и среди опытных растений между собой. Азид натрия же вызывал

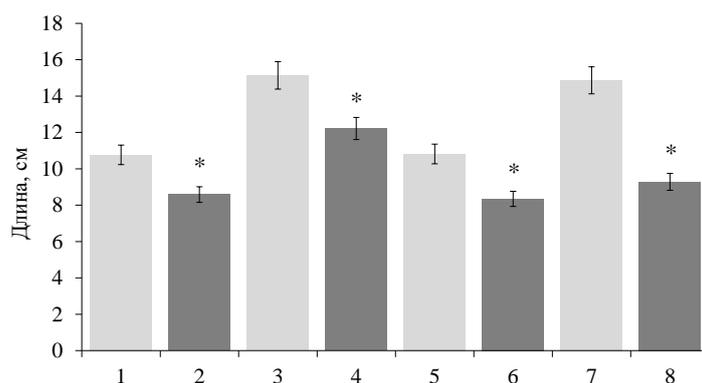


Рис. 3. Длина листа контрольных (светло-серые столбцы) и опытных (серые столбцы) растений *T. sinskajae* M₁ (2018 г.): 1 – первый лист, высокий морфотип (контроль); 2 – первый лист, высокий морфотип (M₁); 3 – второй лист, высокий морфотип (контроль); 4 – второй лист, высокий морфотип (M₁); 5 – первый лист, низкий морфотип (контроль); 6 – первый лист, низкий морфотип (M₁) 7 – второй лист, низкий морфотип (контроль); 8 – второй лист, низкий морфотип (M₁). $n = 100$; * $p < 0.01$

достоверное уменьшение длины листьев. Уменьшение длины листьев у опытных растений M₁ по сравнению с контрольными составило в среднем 20% (рис. 3).

По длине остей между контрольными и опытными растениями достоверной разницы зафиксировано не было.

Таким образом, у обработанных мутагеном растений *T. sinskajae* нами был обнаружен ряд морфологических изменений. Однако данный эффект мог быть результатом не только мутагенного, но и токсического действия азид натрия. Для того чтобы оценить общий мутагенный эффект азид натрия на *T. sinskajae*, было решено провести ISSR-анализ, который часто используют для выявления внутривидового генетического полиморфизма растений. Среди различных вариаций проведенных опытов по мутагенезу при помощи ISSR-анализа удалось достоверно зафиксировать генетические изменения у опытных растений по сравнению с контрольными только после обработки азидом натрия в концентрациях 0.25 и 0.5 мМ. При других концентрациях азид натрия полиморфных ISSR-локусов между контрольными и опытными образцами нам обнаружить пока не удалось; вероятнее всего, это связано с тем, что азид натрия вызывает преимущественно возникновение однонуклеотидных замен, которые ISSR-анализом не могут не выявляться. По данным ISSR-спектров в программе Treason были построены дендрограммы сходства, которые наглядно показывают генетические различия между анализируемыми формами. В результате ISSR-анализа по праймеру ISSR-16 (рис. 4, б) было отмечено четкое отличие опытных образцов (0.25 и 0.5 мМ) от остальных видов и линий. Это говорит о том, что проведенный химический мутагенез можно оценивать с помощью ISSR-анализа. По всей видимости, в вариантах с 0.25 и 0.5 мМ азид натрия произошли довольно серьезные изменения, по крайней мере в межмикросателлитной ДНК, так как мутантные формы пшеницы Синской иногда оказывались даже дальше от своей материнской формы, чем *T. monococtum* и *T. boeoticum*. Кроме того, во всех наших исследованиях определялся кластер *T. monococtum* – *T. boeoticum* – *T. sinskajae*, в то время как *T. urartu* всегда был дальше от этих видов (см. рис. 4). В результате ISSR-

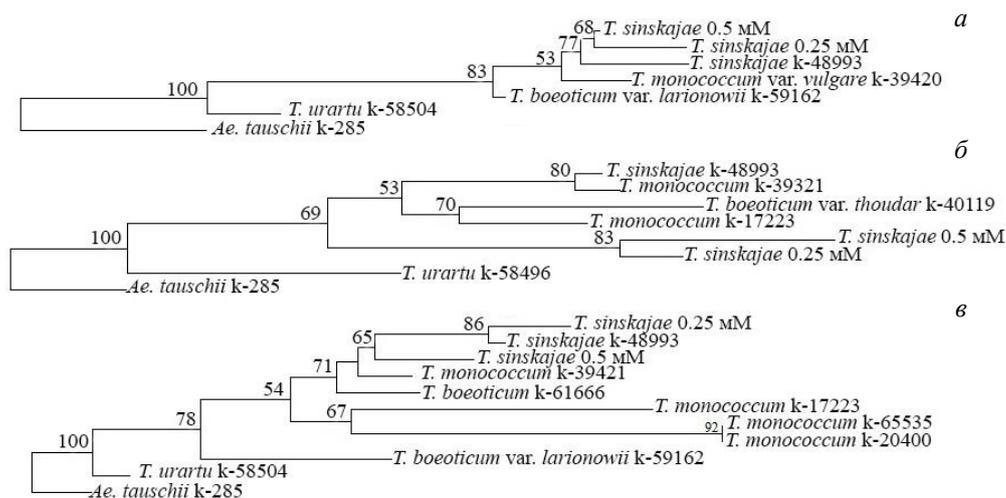


Рис. 4. Дендрограммы сходства, построенные по результатам ISSR-анализа ДНК диплоидных пшениц и мутантных форм *T. sinskajae*: а) с праймером ISSR-33; б) с праймером ISSR-16; в) с праймером ISSR-24

анализа по праймеру ISSR-24 (рис. 4, в) все формы *T. sinskajae* сформировали отдельный кластер, причем форма с обработкой 0.5 мМ азида натрия наиболее сильно отличалась от дикого типа пшеницы Синской. Далее по степени близости расположились различные линии *T. monococcum* и *T. boeoticum*. В результате ISSR-анализа по праймеру ISSR-33 (рис. 4, а) опытные образцы также расположились в отдельном кластере. Образцы, обработанные азидом натрия в концентрациях 0.25 и 0.5 мМ, четко отделились от контрольного (дикого) типа *T. sinskajae*. Контрольные растения *T. sinskajae* отличались по ISSR маркерам и были ближе к *T. monococcum*.

Итак, в первый год исследований нами была отработана технология химического мутагенеза *T. sinskajae*, определена оптимальная концентрация азида натрия, составившая 0.1 мМ, зафиксированы изменения в геноме мутантных растений с помощью ISSR-анализа и проведены морфометрические исследования влияния азида натрия на такие параметры, как длина стебля, колоса и листьев. Было отобрано 70 обработанных 0.1 мМ азида натрия растений *T. sinskajae* с положительными морфометрическими характеристиками, а также были собраны семена для дальнейших исследований.

По результатам морфометрического анализа второго года исследования по длине стебля у высокого морфотипа было выявлено уменьшение его у опытных растений M_1 (2019 г.) на 5–6% по сравнению с контрольными и увеличение у растений M_2 на 7% (рис. 5, а). У низкого морфотипа, наоборот, произошло увеличение длины стебля у опытных растений M_1 на 7–8% от контроля и уменьшение длины стебля у растений M_2 на 4% (рис. 5, б). В то же время у высокого морфотипа было выявлено увеличение длины колоса у опытных растений M_1 на 3–4%, а у растений M_2 на 7–8% по сравнению с контрольными растениями (рис. 5, в). У низкого морфотипа наблюдалось уменьшение длины колоса у опытных растений M_1 на 38%, в то время как мутантные растения M_2 были примерно на уровне контроля (рис. 5, г).

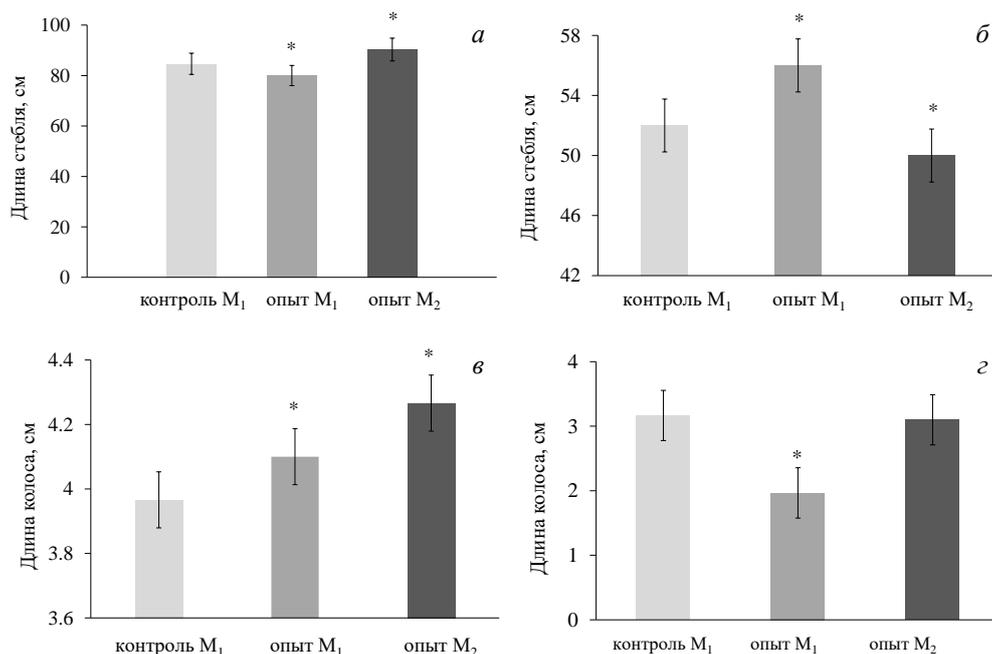


Рис. 5. Результаты морфометрического анализа пшеницы Синской во второй год исследований (2019 г.). Длина стебля *T. sinskajae*: а) высокий морфотип; б) низкий морфотип. Длина колоса *T. sinskajae*: в) высокий морфотип; г) низкий морфотип. $n = 100$; * $p < 0.01$

Одним из важных показателей урожайности является масса зерен. По массе 1000 зерен не было зафиксировано значимых различий между контрольными растениями и опытными растениями M₁ (2018 г.), показатели для растений M₂ (2019 г.) были на уровне значений для контрольных растений и опытных растений M₁ (2019 г.). Но при этом контрольные растения и опытные растения M₁ второго года исследования отличались от опытных растений M₁ первого года исследования по массе 1000 зерен. Различия между контрольными и опытными вариантами разных лет, видимо, обусловлены разными погодными условиями (<https://www.gismeteo.ru/diary>). По другим показателям, таким как число зерен в колосе, длина ости, также не было зафиксировано достоверных отличий. По длине листьев между контрольными и опытными растениями были примерно такие же изменения, как и в опыте первого года. Опытные растения второго поколения по длине листьев оказались на уровне контрольных по обоим исследуемым морфотипам. Из 200 опытных растений были отсеяны больные, с сильными морфологическими отклонениями и не завязавшие семян в количестве 54 шт., остальные 145 мутантов имели нормальные показатели роста. Из них было выделено 78 перспективных короткостебельных форм, семена которых были собраны в целях дальнейшей селекции.

3. Обсуждение

При изучении влияния азидата натрия на растения линии к-48993 *T. sinskajae* нами были обнаружены два морфотипа: низкий и высокий. Низкостебельные формы диплоидных пшениц выявлялись и в других исследованиях. К примеру,

полукарликовая форма [15], а также карликовая форма, полученная от скрещивания [*T. boeoticum* × *T. urartu*] × *T. sinskajae* [6], либо же короткостебельная линия *T. sinskajae dwarf* [16]. Данные формы пшеницы Синской были получены в результате межвидовой гибридизации, отбора и селекции. В работе А.А. Филатенко и У.К. Куркиева [2] описана пшеница Синской, в популяции которой не было короткостебельных форм. В этой работе указанная форма пшеницы обозначена как *T. sinskajae* (к-48993), то есть та линия, которую мы и использовали. Однако, судя по всему, переданная нам из ВИР линия к-48993 все же неоднородна и состоит из короткостебельной и длинностебельной форм. Существенных морфометрических вариаций внутри них нами не обнаружено, что, вероятно, связано с использованием в ходе настоящего исследования одной линии дикой диплоидной пшеницы.

Важным методом оценки мутагенного воздействия азид натрия на растения является морфометрический анализ. Имеется ряд работ, где проводились также физиологические исследования. Например, исследовалось влияние азид натрия на солеустойчивость каллусов [14] или накопление ионов калия в клетках [17]. Однако при работе с новыми объектами всегда возникает вопрос, насколько эффективно происходит мутагенез, каковы причины изменений в морфометрических параметрах анализируемых растений. Нельзя исключать того, что азид натрия может оказывать также токсический эффект, результаты которого вполне могут передаваться в течение нескольких поколений растений через эпигенетические механизмы, однако впоследствии эти уникальные признаки могут быть легко утеряны, так как не закрепляются в геноме. Безусловно, наиболее подходящим методом детекции произошедших изменений в геноме остается полногеномное секвенирование мутантных форм. Но данная процедура является весьма дорогостоящей и вряд ли в ближайшее время цена этого анализа снизится до такой степени, что позволит секвенировать все десятки и даже сотни мутантных форм, получаемых при химическом мутагенезе. Для общей оценки влияния мутагена на геном мы предлагаем использовать метод ISSR-анализа, который хорошо себя зарекомендовал в молекулярной генетике растений для определения уровня внутривидового полиморфизма [18]. Хотя азид натрия преимущественно вызывает возникновение однонуклеотидных замен [7], судя по нашим данным, при его воздействии также возможно возникновение инделов. Действительно, имеются сведения, что в результате обработки азидом натрия могут происходить и хромосомные aberrации, которые приводят к изменению длины нуклеотидной последовательности [19]. Методом ISSR между контрольными образцами и мутантами, полученными при оптимальной концентрации мутагена (0.1 мМ), не были выявлены генетические различия. Вероятнее всего, при низкой концентрации мутагена происходят преимущественно однонуклеотидные замены, которые можно выявить лишь методом полногеномного секвенирования. ISSR-анализ мутантных растений выполняли, чтобы доказать мутагенное действие использованного нами реактива.

Химически индуцированный мутагенез *T. sinskajae* выявил схожие изменения в длине стебля и длине колоса. Можно предположить, что эти две характеристики наследуются у *T. sinskajae* сцепленно. В литературных источниках есть тому подтверждение (см., например, [15]). Причем данная корреляция отмечается и среди обработанных мутагеном растений. Так как азид натрия чаще всего вы-

зывает транзиции, возможно, что в результате действия мутагена были затронуты участки ДНК, отвечающие за длину стебля и колоса. Стоит отметить, что действие азиды натрия различается в случае с высоким и низким морфотипами. Высокий морфотип характеризовался увеличением некоторых частей растения, а низкий – уменьшением. Это еще одно из подтверждений того, что линия к-48993 *T. sinskajae* состоит из двух морфотипов. В то же время опытные растения второго поколения часто по морфометрическим параметрам возвращались к норме, что, возможно, объясняется компенсаторными механизмами в регуляции экспрессии генов или эпигенетическими механизмами.

Заключение

Впервые проведен химической мутагенез *T. sinskajae* с использованием азиды натрия. Полученные морфометрические показатели свидетельствуют о том, что данный мутаген вызывает изменение длины стебля и колоса у растений пшеницы Синской, но не оказывает существенного влияния на длину их листьев и остей, а также на массу семян. Таким образом, применение азиды натрия позволяет получить короткостебельные линии *T. sinskajae*, которые являются перспективными для дальнейшей селекции пшеницы Синской и других видов трибы Пшеницевых.

Благодарности. Исследование А.Р. Кулуева выполнено в рамках государственного задания № 122030200143-8, работы Б.Р. Кулуева поддержаны грантом Минобрнауки РФ (соглашение № 075-15-2021-1066 от 28 сентября 2021 г.).

Литература

1. Zaharieva M., Monneveux P. Cultivated einkorn wheat (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*): The long life of a founder crop of agriculture // Genet. Resour. Crop Evol. – 2014. – V. 61. – P. 677–706. – doi: 10.1007/s10722-014-0084-7.
2. Филатенко А.А., Куркиев У.К. Пшеница Синской (Новый вид – *Triticum sinskajae* A. Filat. et Kurk.) // Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. – 1975. – № 54, № 1. – С. 239–241.
3. Культурная флора СССР / Под общ. рук. Д.Д. Брежнева. – Л.: Колос, 1979. – Т. 1: Пшеница / Ред. тома В.Ф. Дорофеев, О.Н. Коровина. – 347 с.
4. Simons K.J., Fellers J.P., Trick H.N., Zhang Z., Tai Y.-S., Gill. B.S., Faris J.D. Molecular characterization of the major wheat domestication gene *Q* // Genetics. – 2006. – V. 172, No 1. – P. 547–555. – doi: 10.1534/genetics.105.044727.
5. Твердохлеб Е.В. Изменчивость признаков культурной однозернянки *Triticum monococcum* L. и *Triticum sinskajae* A. Filat. et Kurk. // Вісник Харківського національного аграрного університету. Серія Біологія. – 2015. – Вип. 3. – С. 83–90.
6. Куркиев У.К., Филатенко А.А. Новые формы пшеницы Синской (*Triticum sinskajae* A. Filat. et Kurk.) с легким вымолотом зерна и генами низкорослости // Докл. Рос. акад. с.-х. наук. – 2000. – № 4. – С. 10–12.
7. Till B., Cooper J., Tai T.H., Colowit P., Greene E.A., Henikof S., Comai L. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING // BMC Plant Biol. – 2007. – V. 7. – Art. 19, P. 1–12. – doi: 10.1186/1471-2229-7-19.
8. Suprasanna P., Mirajkar S.J., Bhagwat S.G. Induced mutations and crop improvement // Bahadur B., Venkat Rajam M., Sahijram L., Krishnamurthy K. (Eds.) Plant Biology and

- Biotechnology. V. 1: Plant diversity, organization, function and improvement. – New Delhi: Springer, 2015. – P. 593–617. – doi: 10.1007/978-81-322-2286-6_23.
9. Mugnozza G.T.S., Monti L.M. Effects of recurrent mutagenic treatment in *Durum* wheat // *Mutat. Res.* – 1966. – V. 3, No 4. – P. 298–304. – doi: 10.1016/0027-5107(66)90036-4.
 10. Warner R.L., Kudrna D.A., Spaeth S.C., Jones S.S. Dormancy in white-grain mutants of Chinese Spring wheat (*Triticum aestivum* L.) // *Seed Sci. Res.* – 2000. – V. 10, No 1. – P. 51–60. – doi: 10.1017/S0960258500000064.
 11. Srivastava P., Marker S., Pandey P., Tiwari D.K. Mutagenic effects of sodium azide on the growth and yield characteristics in wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) // *Asian J. Plant Sci.* – 2011. – V. 10, No 3. – P. 190–201. – doi: 10.3923/ajps.2011.190.201.
 12. Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue // *Phytochem. Bull.* – 1987. – V. 19, No 1. – P. 11–15.
 13. Нугматуллина Н.В., Кулуев А.Р., Кулуев Б.Р. Молекулярные маркеры, применяемые для определения генетического разнообразия и видоидентификации дикорастущих растений // *Биомика.* – 2018. – Т. 10, № 3. – С. 290–318. – doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-39.
 14. Sen A., Sarsu F. Obtaining candidate salt tolerant wheat mutant lines derived from combination of sodium azide mutagenesis and somatic embryogenesis // *Trakya Univ. J. Nat. Sci.* – 2019. – V. 20, No 2. – P. 129–134. – doi: 10.23902/trkjnat.571255.
 15. Watanabe N. Breeding opportunities for early, free-threshing and semidwarf *Triticum monococcum* L // *Euphytica.* – 2017. – V. 213. – Art. 201, P. 1–11. – doi: 10.1007/s10681-017-1987-0.
 16. Альдеров А.А., Куркиев У.К. К генетике низкорослости диплоидной голозерной линии пшеницы // *Частная генетика растений: Тез. докл. конф., 23–25 мая 1989 г.* – Киев, 1989. – Т. 1. – С. 120–121.
 17. Rascio A., Russo M., Mazzucco L., Platani C., Nicastro G., Di Fonzo N. Enhanced osmotic tolerance of a wheat mutant selected for potassium accumulation // *Plant Sci.* – 2001. – V. 160, No 3. – P. 441–448. – doi: 10.1016/s0168-9452(00)00404-0.
 18. Сбоева Я.В., Васильева Ю.С., Чертов Н.В., Пыстогова Н.А., Боронникова С.В., Календарь Р., Мартыненко Н. Молекулярно-генетическая идентификация популяций сосны обыкновенной и лиственницы сибирской в Пермском крае на основании полиморфизма ISSR-маркеров // *Сиб. лесной журн.* – 2020. – № 4. – С. 35–44. – doi: 10.15372/SJFS20200405.
 19. Wannajindaporn A., Kativat C., Tantasawat P.A. Mutation induction of *Dendrobium* 'Earsakul' using sodium azide // *HortScience.* – 2016. – V. 51, No 11. – P. 1363–1370. – doi: 10.21273/HORTSCI10860-16.

Поступила в редакцию
14.03.2022

Кулуев Азат Разяпович, кандидат биологических наук, научный сотрудник

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН
пр-т Октября, д. 71, лит. 1Е, г. Уфа, 450054, Россия
E-mail: kuluev.azat@yandex.ru

Кулуев Булат Разяпович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией геномики растений

Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН
пр-т Октября, д. 71, лит. 1Е, г. Уфа, 450054, Россия
E-mail: kuluev@bk.ru

Чемерис Алексей Викторович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник
Институт биохимии и генетики УФИЦ РАН
пр-т Октября, д. 71, лит. 1Е, г. Уфа, 450054, Россия
E-mail: chemeris@anrb.ru

ISSN 2542-064X (Print)
ISSN 2500-218X (Online)

UCHENYE ZAPISKI KAZANSKOGO UNIVERSITETA. SERIYA ESTESTVENNYE NAUKI
(Proceedings of Kazan University. Natural Sciences Series)

2022, vol. 164, no. 3, pp. 378–391

ORIGINAL ARTICLE

doi: 10.26907/2542-064X.2022.3.378-391

Chemical Mutagenesis of *Triticum sinskajae* A. Filat. et Kurk. Using Sodium Azide

A.R. Kuluev^{*}, B.R. Kuluev^{**}, A.V. Chemeris^{***}

Institute of Biochemistry and Genetics – Subdivision of the Ufa Federal Research Centre
of the Russian Academy of Sciences, Ufa, 450054 Russia

E-mail: ^{*}kuluev.azat@yandex.ru, ^{**}kuluev@bk.ru, ^{***}chemeris@anrb.ru

Received March 14, 2022

Abstract

This article explores sodium azide-induced mutagenesis in *Triticum sinskajae* cultivated in a test plot within the limits and suburbs of Ufa. The seeds of this diploid wheat were soaked in 0.1–0.6 mM sodium azide solutions in phosphate buffer (pH 3), the control group was not treated with any dosage. The mutagenic effect was assessed by the morphometric changes in the obtained plants during their vegetation and fruiting. The genetic polymorphism of the mutant forms was identified using the ISSR analysis. With regard to the rates of seed germination and subsequent plant growth, the effective concentration of sodium azide for treating *T. sinskajae* was determined – 0.1 mM. The plants developed various morphological alternations in response to sodium azide: longer and shorter stems or spikes at low and high concentrations, respectively. No significant differences were found in the leaf length and 1000-grain weight between the mutant and wild types of plants. It was concluded that ISSR analysis is a promising diagnostic approach to assess the general mutagenic effect of chemical agents on the genome. Following on from the results of the survey, 78 mutant forms of *T. sinskajae* with short stems over a number of generations were selected.

Keywords: *Triticum sinskajae*, mutation, sodium azide, ISSR analysis, genetic polymorphism, diploid wheat, breeding

Acknowledgements. A.R. Kuluev's research was performed as part of state assignment no. 122030200143-8, and B.R. Kuluev's work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement no. 075-15-2021-1066 of September 28, 2021).

Figure Captions

Fig. 1. The graph showing the dependence of seed germination in *T. sinskajae* on the concentration of sodium azide.

Fig. 2. The morphometric analysis of the first generation of *T. sinskajae* (M₁, 2018) after mutagenesis. a) The stem length of the control and experimental (mutant) plants: 1 – short morphotype (control), 2 – short morphotype (M₁), 3 – long morphotype (control), 4 – long morphotype (M₁). b) The spike length of the control and experimental plants: 1 – long morphotype (control), 2 – long morphotype (M₁), 3 – short morphotype (control), 4 – short morphotype (M₁). n = 100; * p < 0.01.

Fig. 3. The leaf length of control (light gray columns) and experimental (grey columns) plants of *T. sinskajae* M₁ (2018). 1 – first leaf, long morphotype (control); 2 – first leaf, long morphotype (M₁); 3 – second leaf, long morphotype (control); 4 – second leaf, long morphotype (M₁); 5 – first leaf,

short morphotype (control); 6 – first leaf, short morphotype (M_1) 7 – second leaf, short morphotype (control); 8 – second leaf, short morphotype (M_1). $n = 100$; * $p < 0.01$.

Fig. 4. Dendrograms of similarity based on the results of the ISSR analysis of the DNA of diploid wheats and the mutant forms of *T. sinskajae*: a) using ISSR-33 primer; b) using ISSR-16 primer; c) using ISSR-24 primer.

Fig. 5. The results of the morphometric analysis of *T. sinskajae* in the second year of the survey (2019). Stem length: a) long morphotype; b) short morphotype. Spike length: c) long morphotype; d) short morphotype. $n = 100$; * $p < 0.01$.

References

- Zaharieva M., Monneveux P. Cultivated einkorn wheat (*Triticum monococcum* L. subsp. *monococcum*): The long life of a founder crop of agriculture. *Genet. Resour. Crop Evol.*, 2014, vol. 61, pp. 677–706. doi: 10.1007/s10722-014-0084-7.
- Filatenko A.A., Kurkiev U.K. Sinskaya wheat (new species – *Triticum sinskajae* A. Filat. et Kurk.). *Tr. Prikl. Bot., Genet. Sel.*, 1975, vol. 54, no. 1, pp. 239–241. (In Russian)
- Dorofeev V.F., Korovina O.N. (Eds.) *Kul'turnaya flora SSSR* [Cultivated Plants of the USSR]. Vol. 1: Wheat. Leningrad, Kolos, 1979. 347 p. (In Russian)
- Simons K.J., Fellers J.P., Trick H.N., Zhang Z., Tai Y.-S., Gill B.S., Faris J.D. Molecular characterization of the major wheat domestication gene *Q*. *Genetics*, 2006, vol. 172, no. 1, pp. 547–555. doi: 10.1534/genetics.105.044727.
- Tverdokhlebov E.V. Variability of traits in the cultivated einkorn wheats *Triticum monococcum* L. and *Triticum sinskajae* A. Filat. et Kurk. *Visn. Khark. Nats. Agrar. Univ. Ser. Biol.*, 2015, no. 3, pp. 83–90. (In Russian)
- Kurkiev U.K., Filatenko A.A. New forms of Sinskaya wheat (*Triticum sinskajae* A. Filat. et Kurk.) with easy threshing and short-stem genes. *Dokl. Ross. Akad. S-kh. Nauk*, 2000, no. 4, pp. 10–12. (In Russian)
- Till B., Cooper J., Tai T.H., Colowit P., Greene E.A., Henikof S., Comai L. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biol.*, 2007, vol. 7, art. 19, pp. 1–12. doi: 10.1186/1471-2229-7-19.
- Suprasanna P., Mirajkar S.J., Bhagwat S.G. Induced mutations and crop improvement. In: Bahadur B., Venkat Rajam M., Sahijram L., Krishnamurthy K. (Eds.) *Plant Biology and Biotechnology*. Vol. 1: Plant diversity, organization, function and improvement. New Delhi, Springer, 2015, pp. 593–617. doi: 10.1007/978-81-322-2286-6_23.
- Mugnozza G.T.S., Monti L.M. Effects of recurrent mutagenic treatment in *Durum* wheat. *Mutat. Res.*, 1966, vol. 3, no. 4, pp. 298–304. doi: 10.1016/0027-5107(66)90036-4.
- Warner R.L., Kudrna D.A., Spaeth S.C., Jones S.S. Dormancy in white-grain mutants of Chinese Spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Seed Sci. Res.*, 2000, vol. 1, no. 1, pp. 51–60. doi: 10.1017/S0960258500000064.
- Srivastava P., Marker S., Pandey P., Tiwari D.K. Mutagenic effects of sodium azide on the growth and yield characteristics in wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). *Asian J. Plant Sci.*, 2011, vol. 10, no. 3, pp. 190–201. doi: 10.3923/ajps.2011.190.201.
- Doyle J.J., Doyle J.L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.*, 1987, vol. 19, no. 1, pp. 11–15.
- Nigmatullina N.V., Kuluev A.R., Kuluev B.R. Molecular markers used to determine the genetic diversity and species identification of wild plants. *Biomika*, 2018, vol. 10, no. 3, pp. 290–318. doi: 10.31301/2221-6197.bmcs.2018-39. (In Russian)
- Sen A., Sarsu F. Obtaining candidate salt tolerant wheat mutant lines derived from combination of sodium azide mutagenesis and somatic embryogenesis. *Trakya Univ. J. Nat. Sci.*, 2019, vol. 20, no. 2, pp. 129–134. doi: 10.23902/trkjnat.571255.
- Watanabe N. Breeding opportunities for early, free-threshing and semidwarf *Triticum monococcum* L. *Euphytica*, 2017, vol. 213, art. 201, pp. 1–11. doi: 10.1007/s10681-017-1987-0.

16. Al'derov A.A., Kurkiev U.K. On the genetics of short-stem diploid naked wheat line. *Tezisy dokladov na konferentsii po chastnoi genetike rastenii* [Proc. Conf. on Private Plant Genetics]. Vol. 1. Kyiv, 1989, pp.120–121. (In Russian)
17. Rascio A., Russo M., Mazzucco L., Platani C., Nicastro G., Di Fonzo N. Enhanced osmotolerance of a wheat mutant selected for potassium accumulation. *Plant Sci.*, 2001, vol. 160, no. 3, pp. 441–448. doi: 10.1016/S0168-9452(00)00404-0.
18. Sboeva Y.V., Vasil'eva U.C., Chertov N.V., Pystogova N.A., Boronnikova S.V., Kalendar R., Martynenko N. Molecular genetic identification of Scots pine and Siberian larch populations in Perm krai based on polymorphism of ISSR-PCR markers. *Sib. Lesn. Zh.*, 2020, no. 4, pp. 35–44. doi: 10.15372/SJFS20200405. (In Russian)
19. Wannajindaporn A., Kativat C., Tantasawat P.A. Mutation induction of *Dendrobium* 'Earsakul' using sodium azide. *HortScience*, 2016, vol. 51, no. 11, pp. 1363–1370. doi: 10.21273/HORTSCI10860-16.

⟨ **Для цитирования:** Кулуев А.Р., Кулуев Б.Р., Чемерис А.В. Химический мутагенез *Triticum sinskajae* A. Filat. et Kurk. при помощи азиды натрия // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2022. – Т. 164, кн. 3. – С. 378–391. – doi: 10.26907/2542-064X.2022.3.378-391. ⟩

⟨ **For citation:** Kuluev A.R., Kuluev B.R., Chemeris A.V. Chemical mutagenesis of *Triticum sinskajae* A. Filat. et Kurk. using sodium azide. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2022, vol. 164, no. 3, pp. 378–391. doi: 10.26907/2542-064X.2022.3.378-391. (In Russian) ⟩