

ГЕНЕТИКА КУЛЬТУРНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ДИКИХ РОДИЧЕЙ

Научная статья

УДК 633.358:631.528.62:57.088.1

DOI: 10.30901/2227-8834-2022-3-111-122



Создание исходного материала для селекции гороха методом химического мутагенеза и оценка его генетического разнообразия с использованием SSR-маркеров

К. П. Гайнуллина^{1,2}, Б. Р. Кулуев¹, Ф. А. Давлетов²¹Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Институт биохимии и генетики, Уфа, Россия²Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства, Уфа, Россия

Автор, ответственный за переписку: Карина Петровна Гайнуллина, karina28021985@yandex.ru

Актуальность. Горох посевной (*Pisum sativum* L.) является ценной зернобобовой культурой мирового значения. Основной проблемой современной селекции культурных растений, в том числе гороха, стало снижение генетического разнообразия. Один из способов повышения генетического полиморфизма – применение химически индуцированного мутагенеза. Азид натрия (NaN_3) является высокоэффективным химическим мутагеном, который с успехом применяется в мутационной селекции для повышения продуктивности культурных растений и приобретения ими новых признаков, в связи с этим он был использован нами для получения нового селекционного материала гороха.

Материалы и методы. Проведены опыты по получению мутантов гороха сорта 'Памяти Хангильдина' с помощью азид натрия в концентрации 1, 5 и 10 мМ и времени воздействия 3 и 9 ч. Молекулярно-генетический полиморфизм растений M_2 и исходного сорта оценивали с использованием 10 SSR-маркеров из геномной библиотеки микросателлитов (Agrogene®, Франция).

Результаты. Установлены оптимальные концентрации азид натрия и продолжительность обработки им семян: 1–5 мМ в течение 3 ч. Получено 16 мутантных популяций, у 10 из которых было обнаружено изменение типа листовой пластины. Анализ элементов продуктивности выявил достоверное превосходство ($p < 0,05$) над исходным сортом 'Памяти Хангильдина' мутантных популяций № 1, № 5, № 9, № 10, № 15, № 16 по количеству семян в бобе, № 9, № 16 – по массе 1000 семян, № 16 – по массе семян с растения. Построенная на основе данных SSR-анализа дендрограмма отражает степень различий между популяциями растений гороха M_2 и исходным сортом 'Памяти Хангильдина'.

Заключение. Полученные мутантные популяции планируется использовать в селекции гороха как источники высокой озерненности бобов, семенной продуктивности, массы семян с растения и крупности семян. Микросателлитный анализ, выполненный по 10 SSR-маркерам, выявил различия между мутантными популяциями M_2 на генетическом уровне и позволил их паспортизировать.

Ключевые слова: *Pisum sativum*, азид натрия, семенная продуктивность, микросателлитные маркеры, генетический полиморфизм

Благодарности: работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (региональный конкурс) № 22-14-20049 (соглашение № 1 от 06.06.2022 г.).

Авторы благодарят рецензентов за их вклад в экспертную оценку этой работы.

Для цитирования: Гайнуллина К.П., Кулуев Б.Р., Давлетов Ф.А. Создание исходного материала для селекции гороха методом химического мутагенеза и оценка его генетического разнообразия с использованием SSR-маркеров. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2022;183(3):111-122. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-3-111-122

GENETICS OF CULTIVATED PLANTS AND THEIR WILD RELATIVES

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2022-3-111-122

Development of source material for pea breeding through chemical mutagenesis and evaluation of its genetic diversity using SSR markersKarina P. Gainullina^{1,2}, Bulat R. Kuluev¹, Firzinat A. Davletov²¹ Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa, Russia² Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Bashkir Research Institute of Agriculture, Ufa, Russia**Corresponding author:** Karina P. Gainullina, karina28021985@yandex.ru

Background. Pea (*Pisum sativum* L.) is a valuable leguminous crop of worldwide importance. The main problem of modern plant breeding is a decrease in the genetic diversity of crops, including pea. One of the ways to increase genetic polymorphism is the use of chemically induced mutagenesis. Sodium azide (NaN₃) is a highly effective chemical mutagen successfully used in mutation breeding to increase the productivity of cultivated plants and enrich them with new useful traits. We used it to obtain new pea breeding material.

Materials and methods. Experiments were carried out to obtain pea mutants using sodium azide at the concentrations of 1, 5 and 10 mM and the exposure time of 3 and 9 h. Molecular genetic polymorphism of the M₂ plants and the original cultivar was assessed using 10 SSR markers from the microsatellite genomic library (AgroGene®, France).

Results. Optimal concentrations of sodium azide and the duration of seed treatment with it were identified: 1–5 mM for 3 h. Sixteen mutant populations were obtained; in ten of them a change in the leaf type was found. An analysis of the yield structure components revealed a significant superiority ($p < 0.05$) over the initial cultivar 'Pamyati Khangildina' in the mutant populations No. 1, No. 5, No. 9, No. 10, No. 15 and No. 16 in the number of seeds per pod, No. 9 and No. 16 in the weight of 1000 seeds, and No. 16 in the weight of seeds per plant. A dendrogram constructed on the basis of the SSR analysis data showed the degree of differences between the M₂ populations of pea plants and the initial cultivar 'Pamyati Khangildina'.

Conclusion. The obtained mutant populations are planned to be used in pea breeding as sources of high seed numbers in pods, seed yield, seed weight per plant, and large seed size. A microsatellite analysis with 10 SSR markers revealed differences among the M₂ mutant populations at the genetic level and made it possible to identify them.

Keywords: *Pisum sativum*, sodium azide, seed yield, microsatellite markers, genetic polymorphism

Acknowledgments: the work was carried out with financial support from the grant of the Russian Science Foundation (regional competition): No. 22-14-20049 (Agreement No. 1 of 06.06.2022).

The authors thank the reviewers for their contribution to the peer review of this work.

For citation: Gainullina K.P., Kuluev B.R., Davletov F.A. Development of source material for pea breeding through chemical mutagenesis and evaluation of its genetic diversity using SSR markers. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2022;183(3):111-122. DOI: 10.30901/2227-8834-2022-3-111-122

Введение

Горох посевной (*Pisum sativum* L.) – основная зернобобовая культура в Российской Федерации и широко распространенная в странах с умеренным климатом (Makasheva, 1973; Gainullina et al., 2020). Этот вид является важным источником растительного белка и используется в различных отраслях пищевой промышленности и производстве кормов для животных. Горох способен давать высокие урожаи зерна даже в зоне рискованного земледелия, к которой относится большая часть территории нашей страны. Создание новых высокопродуктивных сортов гороха, наиболее полно реализующих почвенно-климатический потенциал и отвечающих требованиям сельскохозяйственного производства, является актуальной задачей современной селекции. Одна из главных проблем, с которой сталкивается современная селекция, – снижение генетического разнообразия исходного материала (Lee, 1998; Dzyubenko, 2012).

Генетическая изменчивость играет основополагающую роль в селекции растений, размножающихся вегетативным и половым путем (Divanli-Türkan et al., 2006; Jain, 2012). Источником полиморфизма могут быть мутации, возникающие как в естественных условиях, так и в результате искусственного мутагенеза с использованием физических, биологических или химических мутагенов. С помощью индуцированного мутагенеза к настоящему времени было создано более 3000 мутантных сортов культурных растений с улучшенными хозяйственно ценными признаками (Broertjes, van Harten, 1991; Kharkwal, Shu, 2009; Jain, Suprasanna, 2011; Suprasanna et al., 2015). Их широкое внедрение в производство способствовало повышению уровня продовольственной безопасности (Suprasanna et al., 2015).

Химические мутагены вызывают, в основном с высокой частотой, точечные мутации. Обычно для химического мутагенеза применяются диметилсульфат, диэтилсульфат, этилметансульфонат и азид натрия (Maluszynski et al., 2009). Установлено, что воздействие азид натрия приводит к заменам пар оснований, чаще всего GC→AT (Till et al., 2007). Также в результате обработки азидом натрия могут происходить хромосомные aberrации, которые приводят к изменению длины нуклеотидной последовательности (Wannajindaporn et al., 2016).

В мутационной селекции для генетического анализа широко применяются ДНК-маркеры. Они дают возможность отслеживать родословные мутантов, оценивать их генетический полиморфизм. Прямой отбор мутантов на основе ДНК-маркеров позволяет обойти ограничения, связанные с использованием изменений морфологических признаков в качестве маркеров мутаций (влияние факторов внешней среды, плейотропный эффект генов, отсутствие фенотипического проявления мутации), повышает эффективность, а также снижает трудоемкость и время отбора (Wannajindaporn et al., 2016). Так, успешное применение высокополиморфных кодоминантных микросателлитных маркеров (SSR – simple sequence repeat) для идентификации мутантов, полученных в результате воздействия азид натрия, и оценки их генетического разнообразия подтверждается исследованиями A. Şen и F. Sarsu (2018). SSR-маркеры характеризуются равномерным распределением в растительных геномах, и их локализация не ограничивается некодирующими областями: многие из них обнаруживаются в кодирующих последовательностях генов, что позволяет разрабатывать так называемые «генные» SSR-маркеры на осно-

ве доступных EST (expressed sequence tag) (Varshney et al., 2005).

Целью исследования стало создание селекционного материала гороха путем химически индуцированного мутагенеза с помощью азид натрия с последующей оценкой полиморфизма мутантных популяций методом SSR-анализа.

Материалы и методы

Исследования проводились в 2019–2021 гг. В качестве материала для опытов по химически индуцированному мутагенезу были использованы семена гороха сорта 'Памяти Хангильдина', созданного селекционерами Башкирского научно-исследовательского института сельского хозяйства Уфимского федерального исследовательского центра РАН (Башкирский НИИСХ УФИЦ РАН). Сорт гороха 'Памяти Хангильдина', характеризующийся полукарликовым стеблем, усатым типом листа, неосыпающимися семенами, высокой урожайностью, широкими адаптационными способностями, с 2012 г. рекомендован к возделыванию в Волго-Вятском, Средневолжском и Уральском регионах РФ (Davletov, 2015).

Согласно литературным данным, концентрация азид натрия (NaN_3) и время обработки семян, применяемые для химически индуцированного мутагенеза гороха, различаются (Kleinhofs et al., 1978; Kumar, 1988; Divanli-Türkan et al., 2006). В наших опытах сухие, неповрежденные семена гороха сорта 'Памяти Хангильдина' по 100 шт. помещали в стеклянные колбы и инкубировали в 100 мл фосфатного буфера (pH = 3) с добавлением азид натрия в концентрации 1, 5 и 10 мМ и без него при комнатной температуре. Время обработки составляло 3 и 9 часов (ч). По истечении времени обработки семена промывали проточной водопроводной водой в течение 20 мин и дистиллированной водой – 5 мин, после чего высевали на опытные делянки. На контрольную делянку были высеяны необработанные сухие семена гороха сорта 'Памяти Хангильдина' (100 шт.). Посев проводился 30 апреля 2019 г. Площадь питания растений составляла 20 × 5 см.

Семена, полученные от растений гороха M_1 , в 2020 г. были высеяны 18 мая и дали начало 16 мутантным популяциям M_2 . В период вегетации в 2019 и 2020 г. проводили фенологические наблюдения. Отмечали даты всходов, цветения и полной спелости. За начало каждой фазы принимали день, когда в нее вступают 10–15% растений, а за полное наступление фазы – 75% растений. На основании полученных данных определяли продолжительность полного вегетационного и межфазных периодов. После уборки и просушки растения анализировали по морфологическим и хозяйственно ценным признакам.

SSR-анализ мутантных популяций гороха M_2 выполнялся методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) по 10 микросателлитным маркерам из геномной библиотеки микросателлитов Agrogene® (Moissy Gramayel, Франция), характеристика которых представлена в таблице 1.

Для выделения ДНК использовали по 50 мг высушенных листьев. Для выявления возможного внутрисортного и внутривидового полиморфизма анализировали по 3–5 растений каждой из исследуемых мутантных популяций гороха M_2 и 5 растений сорта 'Памяти Хангильдина'. ДНК выделяли с помощью набора Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Литва). ПЦР проводили в амплификаторе T-100 (Bio-Rad Laboratories, США). Конечный объем реакционной смеси составлял 20 мкл и содержал 1 мкл раствора тотальной геномной

Таблица 1. SSR-маркеры, использованные для молекулярно-генетического анализа мутантных популяций гороха M₂**Table 1. SSR markers used for the molecular genetic analysis of the M₂ pea mutant populations**

SSR-маркер / SSR marker	Последовательность праймера от 5' к 3' / Primer sequence from 5' to 3'	Температура отжига праймеров (T _m), °C / Annealing temperature of primers (T _m), °C	Число аллелей / Number of alleles	Размер ампликона, пар нуклеотидов / Amplicon size, base pairs
AA5	F: TGCCAATCCTGAGGTATTAACACC R: CATTTTTCAGTTGCAATTTTCGT	48	7	235
AA200	F: ACCGAAGAGCATTTTTCCTAAG R: TCCATCAGTTCCCTAATTCATC	48	4	220
AA355	F: AGAAAAATTCTAGCATGATACTG R: GGAAATATAACCTCAATAACACA	48	7	180
AB28	F: CCTGAGTCATCACATAGGAGAT R: GCAGAAGTATTTGACTTGATGGAA	44	4	377
AB53	F: CGTCGTTGTTGCCGGTAG R: AAACACGTCATCTCGACCTGC	53	7	120
AB71	F: CCAACCATTTGTGAGTTCCTT R: TTCGTGCAACCACGAGAATAGA	53	5	145
AD61	F: CTCATTC AATGATGATAATCCTA R: ATGAGGTA CTTGTGTGAGATAAA	53	7	138
AD147	F: AGCCCAAGTTTCTTCTGAATCC R: AAATTCGCAGAGCGTTGTTCAC	48	7	330
D21	F: TATCTCTCTCCAAAATTTTCCTT R: GTCAAAAATTAGCCAAAATTCCTC	51	6	200
Hex42	F: CTAAGAGCCCAACACCAACA R: GTGGGGATAAGGGGAGAGAG	48	5	180

ДНК, 7,5 мкл раствора Dream Taq™ PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Литва), по 2 мкл каждого из пары праймеров («Евроген», Россия) и 7,5 мкл стерильной деионизированной воды. Программа амплификации включала следующие этапы: начальная денатурация при 94°C – 4 мин; 35 циклов: денатурация при 94°C – 30 с, отжиг праймеров при T_m ± 2°C – 30 с, элонгация при 72°C – 1 мин, конечная элонгация при 72°C – 10 мин. Температуру плавления праймеров (T_m) определяли с помощью программы PrimerSelect (DNASar, USA).

Продукты амплификации разделяли методом вертикального электрофореза в камере VE-20 («Хеликон», Россия) в 10-процентном полиакриламидном геле в течение 4–6 ч при напряжении 400 В. Визуализацию и документирование результатов электрофореза осуществляли при помощи гель-документирующей системы Gel Doc™ EZ Imager (Bio-Rad, США).

Для статистической обработки данных, полученных в результате структурного анализа растений гороха M₂, использовали программу MS Excel 2010, достоверность различий определяли с помощью U-критерия Манна-Уитни. Информативность изученных SSR-маркеров оценивали по величине PIC (Polymorphism Information Content). Кластерный анализ проводили методом ближайшего соседа (одиночной связи) путем вычисления матрицы нормированных евклидовых расстояний с помощью программы StatSoft® STATISTICA 13.3.

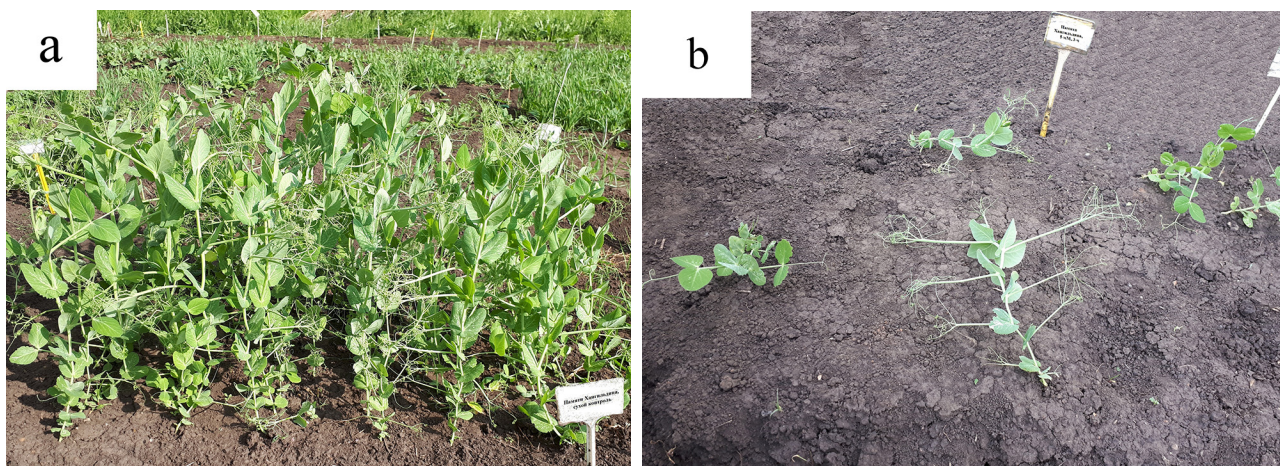
Результаты

В 2019 г. изучили воздействие различных концентраций азиды натрия и продолжительности обработки на прорастание семян гороха сорта 'Памяти Хангильдина'. Появление всходов было отмечено на десятый день после посева на контрольной делянке и на опытных делянках, куда были высеяны семена, инкубированные в фосфатном буфере без добавления азиды натрия в течение 3 и 9 ч и в фосфатном буфере с концентрацией азиды натрия 1 мМ в течение 3 ч. Наиболее ранними и дружными были всходы на контрольной делянке, в то время как на опытных делянках с вариантами обработки семян азидом натрия в концентрации 5 и 10 мМ в течение 3 ч, а также 1 мМ в течение 9 ч появление всходов полностью завершилось лишь через 21 день после посева. Данные о всхожести семян гороха на контрольной и опытных делянках приведены в таблице 2.

Во время вегетации гороха M₁ проводились фенологические наблюдения и описание морфологических и хозяйственно ценных признаков растений. Было отмечено замедление темпов роста, появление карликовых форм, листочковых форм, а также растений с сильно изогнутыми, зигзагообразными стеблями (рис. 1). После созревания семена с каждого растения M₁ были собраны отдельно. Всего с растений M₁, полученных в результате инкубирования семян гороха сорта 'Памяти Хангильдина'

Таблица 2. Всхожесть семян гороха сорта 'Памяти Хангильдина' в зависимости от варианта обработки мутагеном в 2019 г.**Table 2.** Pea seed germination rates of cv. 'Pamyati Khangildina' depending on the version of mutagen treatment in 2019

Вариант обработки семян мутагеном / Version of seed mutagen treatment	Всхожесть семян, % / Seed germination rate, %
Контроль (без обработки) / Control (without treatment)	85
Фосфатный буфер, 3 ч / Phosphate buffer, 3 h	25
Фосфатный буфер, 9 ч / Phosphate buffer, 9 h	23
Азид натрия (1 мМ), 3 ч / Sodium azide (1 mM), 3 h	7
Азид натрия (5 мМ), 3 ч / Sodium azide (5 mM), 3 h	5
Азид натрия (10 мМ), 3 ч / Sodium azide (10 mM), 3 h	1
Азид натрия (1 мМ), 9 ч / Sodium azide (1 mM), 9 h	3
Азид натрия (5 мМ), 9 ч / Sodium azide (5 mM), 9 h	0
Азид натрия (10 мМ), 9 ч / Sodium azide (10 mM), 9 h	0

**Рис. 1.** Растения гороха сорта 'Памяти Хангильдина' и мутанты M_1 :
а – контроль, б – обработка семян азидом натрия в концентрации 5 мМ в течение 3 ч**Fig. 1.** Pea plants of cv. 'Pamyati Khangildina' and the M_1 mutants:
a – control, b – seed treatment with sodium azide at the concentration of 5 mM for 3 h

с 1 мМ азид натрия в течение 3 ч, было получено 155 семян, с 5 мМ азид натрия в течение 3 ч – 106 семян, с 10 мМ азид натрия в течение 3 ч – 27 семян, с 1 мМ азид натрия в течение 9 ч – 66 семян.

В 2020 г. семена с каждого из полученных 16 растений M_1 были высеваны на отдельные опытные делянки. В результате визуальной оценки всходов установили, что длительность обработки семян гороха мутагеном (NaN_3) и его концентрация оказывали негативное влияние на прорастание семян даже во втором поколении мутантов (M_2). Вероятно, увеличение времени воздействия азид натрия с 3 до 9 ч и его концентрации от 1 до 10 мМ привели к различным нарушениям в процессе формирования семян на растениях M_1 , что вызвало снижение их всхожести при посеве в 2020 г. (табл. 3).

Растения гороха M_2 также изучали по морфологическим, хозяйственно ценным и фенологическим признакам. Было выявлено, что под воздействием NaN_3 у растений 10 из 16 мутантных популяций произошло изменение типа листовой пластины, усатый лист превратился

в листочковый. Продолжительность вегетационного периода у мутантных растений составляла 64–70 суток, в то время как у сорта 'Памяти Хангильдина' – 67 суток. Наиболее скороспелыми оказались мутантные популяции № 3, № 12, № 13, № 15 (см. табл. 3).

У большинства мутантных популяций наблюдалось расщепление по ряду изученных признаков: часть растений имела тонкие стебли, характеризовалась сильным полеганием, слабо развитым листовым аппаратом, низкой продуктивностью, часть отличалась прочными неполегающими стеблями, крупными прилистниками и листьями, большим числом и высокой массой семян с растения (рис. 2).

Структурный анализ растений, проведенный после созревания семян и уборки, выявил различия между мутантными популяциями M_2 по элементам продуктивности (рис. 3).

По озерненности боба исходный сорт 'Памяти Хангильдина' достоверно превосходили мутантные популяции гороха № 1 (эмпирическое значение стандартизи-

Таблица 3. Характеристика мутантных популяций гороха M_2 (2020 г.)Table 3. Characteristics of the M_2 mutant pea populations (2020)

№ мутантной популяции M_2 / No. of the M_2 mutant population	Вариант обработки семян мутагеном / Version of seed mutagen treatment	Количество высеянных семян, шт. / Number of sown seeds, pcs.	Всхожесть семян, % / Seed germination rate, %	Дата / Date			Вегетационный период, сутки / Growing season, days
				Всходы / Seedlings	Цветение / Flowering	Созревание / Maturation	
1	1 мМ NaN_3 , 3 ч / 1 мМ NaN_3 , 3 h	5	100	25.V	09.VII	30.VII	66
2	1 мМ NaN_3 , 3 ч / 1 мМ NaN_3 , 3 h	20	75	25.V	03.VII	03.VIII	70
3	1 мМ NaN_3 , 3 ч / 1 мМ NaN_3 , 3 h	10	50	25.V	05.VII	28.VII	64
4	1 мМ NaN_3 , 3 ч / 1 мМ NaN_3 , 3 h	18	72	25.V	09.VII	03.VIII	70
5	1 мМ NaN_3 , 3 ч / 1 мМ NaN_3 , 3 h	7	71	25.V	07.VII	03.VIII	70
6	1 мМ NaN_3 , 3 ч / 1 мМ NaN_3 , 3 h	63	68	25.V	03.VII	30.VII	66
7	1 мМ NaN_3 , 9 ч / 1 мМ NaN_3 , 9 h	30	27	25.V	07.VII	03.VIII	70
8	1 мМ NaN_3 , 9 ч / 1 мМ NaN_3 , 9 h	23	39	25.V	03.VII	30.VII	66
9	5 мМ NaN_3 , 3 ч / 5 мМ NaN_3 , 3 h	18	39	25.V	07.VII	03.VIII	70
10	5 мМ NaN_3 , 3 ч / 5 мМ NaN_3 , 3 h	12	25	25.V	03.VII	30.VII	66
11	5 мМ NaN_3 , 3 ч / 5 мМ NaN_3 , 3 h	31	19	25.V	07.VII	30.VII	66
12	5 мМ NaN_3 , 3 ч / 5 мМ NaN_3 , 3 h	26	58	25.V	03.VII	28.VII	64
13	1 мМ NaN_3 , 9 ч / 1 мМ NaN_3 , 9 h	13	23	25.V	03.VII	28.VII	64
14	10 мМ NaN_3 , 3 ч / 10 мМ NaN_3 , 3 h	27	48	25.V	03.VII	31.VII	67
15	5 мМ NaN_3 , 3 ч / 5 мМ NaN_3 , 3 h	19	21	25.V	07.VII	28.VII	64
16	1 мМ NaN_3 , 3 ч / 1 мМ NaN_3 , 3 h	32	38	25.V	09.VII	03.VIII	70



Рис. 2. Растение мутантной популяции гороха № 16 с измененной архитектурой листостебельной системы в период цветения

Fig. 2. A plant of pea mutant population No. 16 with modified architectonics of the leaf-stem system during the flowering period

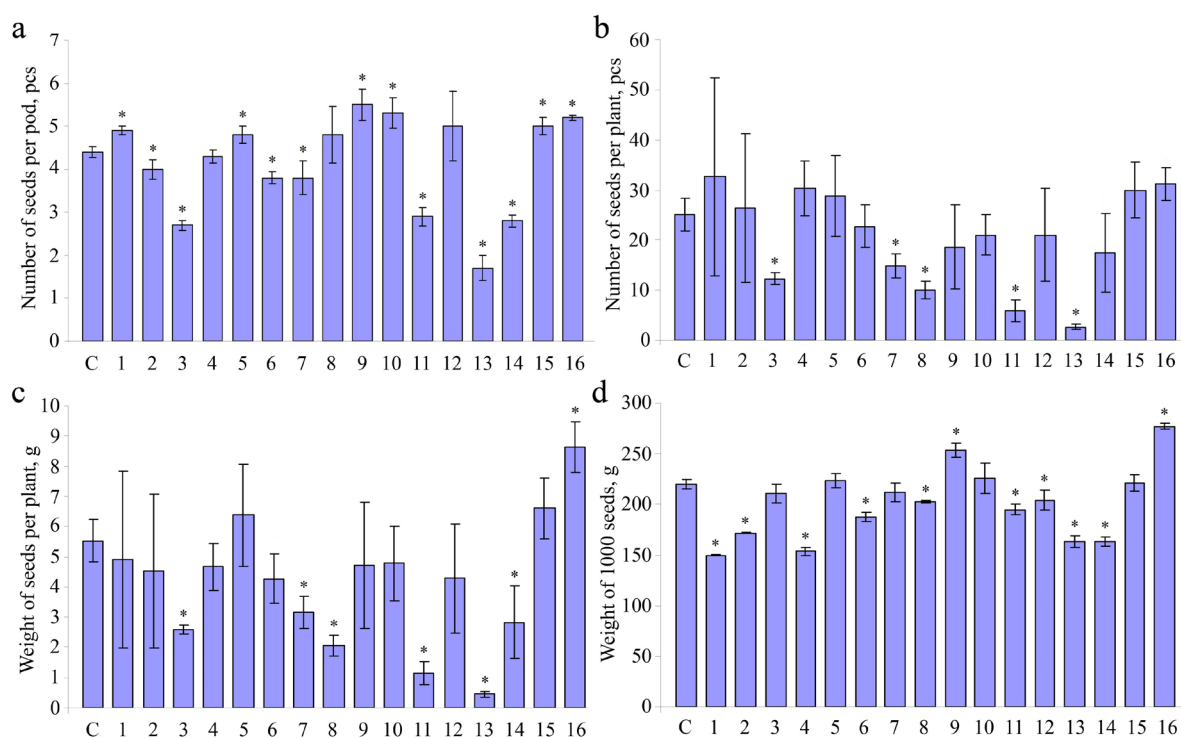


Рис. 3. Показатели элементов структуры урожая растений гороха:

a – количество семян в бобе; **b** – количество семян с растения; **c** – масса семян с растения; **d** – масса 1000 семян.
 C – контроль (сорт 'Памяти Хангильдина'); 1–16 – мутантные популяции № 1–№ 16.

* Различия достоверны при $p < 0,05$

Fig. 3. Indicators of the yield structure components of pea plants:

a – number of seeds per pod; **b** – number of seeds per plant; **c** – weight of seeds per plant; **d** – weight of 1000 seeds.
 C – control (cv. 'Pamyati Khangildina'); 1–16 – mutant populations No. 1–No. 16.

* Differences are significant at $p < 0.05$

рованной переменной U-критерия Манна – Уитни (Z) и уровень значимости (p) – Z = -2,69, p = 0,007), № 5 (Z = -2,69, p = 0,007), № 9 (Z = -3,36, p = 0,0008), № 10 (Z = -2,69, p = 0,007), № 15 (Z = -2,69, p = 0,007), № 16 (Z = -3,62, p = 0,0003) с количеством семян в бобе $4,9 \pm 0,1$; $4,8 \pm 0,2$; $5,5 \pm 0,4$; $5,3 \pm 0,3$; $5,0 \pm 0,2$; $5,2 \pm 0,1$ шт. соответственно. Наибольшим количеством семян с растения (32,7 ± 19,8 шт.) характеризовалась мутантная популяция № 16, однако на 5-процентном уровне значимости достоверных различий по данному признаку с сортом ‘Памяти Хангильдина’ выявлено не было (см. рис. 3).

Масса семян с растения – важнейший комплексный признак, который характеризует семенную продуктивность гороха. По данному признаку статистически достоверно (Z = -3,62, p = 0,0003) превзошла сорт ‘Памяти Хангильдина’ мутантная популяция гороха № 16 ($8,63 \pm 0,83$ г). Масса 1000 семян является показателем крупности и выполненности семян и характеризует качество семенного материала гороха. В наших опытах максимальными значениями массы 1000 семян характеризовались мутантные популяции № 9 ($253,4 \pm 6,7$ г)

и № 16 ($277,2 \pm 2,9$ г), превысившие сорт ‘Памяти Хангильдина’ на 5-процентном уровне значимости (Z = -3,36, p = 0,0008, Z = -3,62, p = 0,0003 соответственно) (см. рис. 3).

Таким образом, одновременно по трем признакам продуктивности (озерненность боба, масса семян с растения, масса 1000 семян) достоверно (p < 0,05) превзошла исходный сорт ‘Памяти Хангильдина’ мутантная популяция гороха № 16, отличающаяся также наибольшим количеством бобов на растении и крупными семенами (рис. 4).

Мутантные популяции гороха M₂ с измененным морфотипом (листочковым), 8 из которых выделились по отдельным хозяйственно ценным признакам или их комплексу (см. рис. 3), были отобраны нами для оценки молекулярно-генетического полиморфизма с помощью микросателлитных маркеров. Таким образом, был проведен анализ 10 мутантных популяций (№ 1, № 2, № 4, № 5, № 7, № 9, № 12, № 14–№ 16) и сорта ‘Памяти Хангильдина’ по 10 SSR-локусам (AA5, AA200, AA355, AB28, AB53, AB71, AD61, AD147, D21, Hex42). В результате амплификации был выявлен 41 аллель (табл. 4).



Рис. 4. Бобы (а) и семена (б) мутантной популяции гороха № 16 и семена сорта ‘Памяти Хангильдина’ (с)

Fig. 4. Pods (a) and seeds (b) of pea mutant population No. 16, and seeds of cv. ‘Pamyati Khangildina’ (c)

Таблица 4. Результаты генотипирования мутантных популяций гороха M₂ и сорта ‘Памяти Хангильдина’

Table 4. Genotyping results for the M₂ pea mutant populations and cv. ‘Pamyati Khangildina’

Образец Sample	SSR-маркер SSR marker									
	AA 5	AA 200	AA 355	AB 28	AB 53	AB 71	AD 61	AD 147	D 21	Hex 42
Сорт Памяти Хангильдина / Св. Pamyati Khangildina	A, D	B, D	E, I	E, H	A, B	G, I	A, B	A, D	A	A
Мутантная популяция № 1 / Mutant population No. 1	A, D	B, D	E, I	E	A, B	G, I	A, B	A, D	A	A, C
Мутантная популяция № 2 / Mutant population No. 2	A, D	B, D	E, I	E, H	A, B	G, I	A, B	A, D	A	A, C
Мутантная популяция № 4 / Mutant population No. 4	F, I	B, D	E, I	E, H	A, B	G, I	A, B	A, D	I, K	C, F
Мутантная популяция № 5 / Mutant population No. 5	A, D	B, D	E, I	E, H	A, B	J, K	A, B	A, D	A	A, C
Мутантная популяция № 7 / Mutant population No. 7	A, D	B, D	E, I	E, H	A, B	G, I	A	A, D	A	A, C
Мутантная популяция № 9 / Mutant population No. 9	A, D	A, F	E, I	A, E	B	A, D	A, B	B, E	A	A

Таблица 4. Окончание'

Table 4. The end

Образец Sample	SSR-маркер SSR marker									
	AA 5	AA 200	AA 355	AB 28	AB 53	AB 71	AD 61	AD 147	D 21	Hex 42
Мутантная популяция № 12 / Mutant population No. 12	A, D	B, D	E, I	E	A, B	G, I	A	A, D	A	A, C
Мутантная популяция № 14 / Mutant population No. 14	A, D	C, E	E, I	E, H	B	G, I	A, B	A, D	C, E	A
Мутантная популяция № 15 / Mutant population No. 15	A, D	A, F	E, I	A, E	B	A, D	A, D	B, E	A	A, C
Мутантная популяция № 16 / Mutant population No. 16	A, D	B, G	E, I	A, E	B	G, I	A, D	E, H	A	A

Примечание: буквенные обозначения аллелей присвоены случайным образом в алфавитном порядке. Часть аллелей, отсутствующих в данной выборке (например, аллель D маркера AA200), были ранее нами обнаружены у сортообразцов, не вошедших в представленное исследование (Gainullina et al., 2020)

Note: Letter symbols for the alleles were assigned at random in alphabetical order. Some of the alleles that are missing in this set (for example, the D allele of marker AA200) were previously detected in cultivar samples that were not included in the present study (Gainullina et al., 2020)

Число аллелей, амплифицированных в каждом из локусов, менялось от 2 (AA355, AB53) до 7 (AA200) и в среднем составляло 4,1 аллеля на локус (рис. 5). По локусу AA355 полиморфных аллелей не было выявлено.

Для исследованных SSR-маркеров рассчитали индекс полиморфизма, который в зависимости от локуса варьировал от 0,43 (AB53) до 0,74 (AA200) и в среднем равнялся 0,59. На основе данных, полученных в результате оценки молекулярно-генетического полиморфизма мутантных популяций гороха M_2 и сорта 'Памяти Хангильдина', был проведен кластерный анализ и построена дендрограмма, которая отражает распределение генотипов,

изученных образцов в соответствии с их генетическим сходством (рис. 6).

Анализ взаимного расположения образцов на дендрограмме показал, что наиболее близкими между собой и с исходным сортом 'Памяти Хангильдина' оказались мутантные популяции гороха № 1, № 2, № 7, № 12, объединенные с ним в одном кластере. Отдельно сгруппировались мутантные популяции гороха № 9 и № 15, отличающиеся высокой продуктивностью. Также относительно обособленно на дендрограмме расположилась мутантная популяция № 16, выделившаяся наибольшими изменениями листостебельной системы и комплексом хозяйственно ценных признаков.

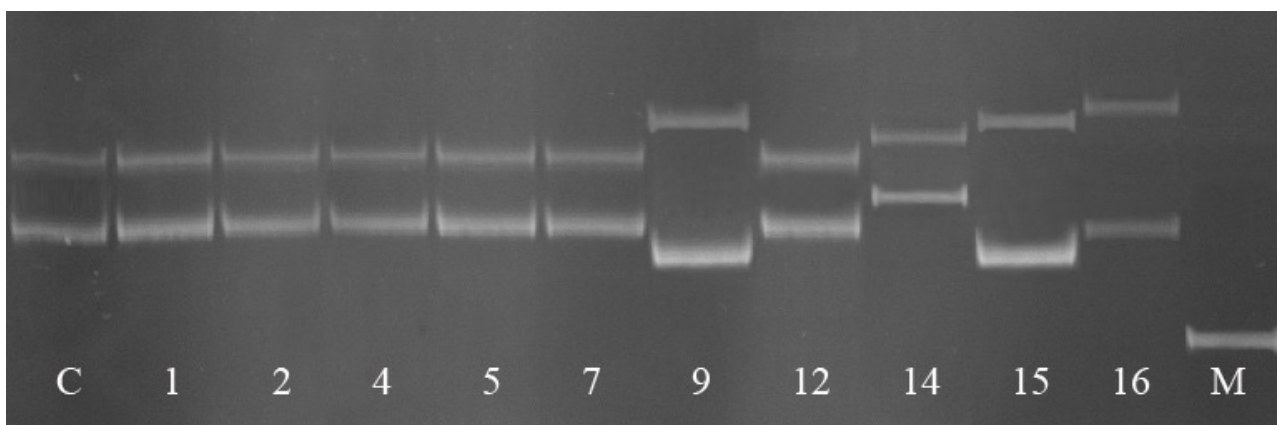


Рис. 5. Электрофоретические спектры, полученные при амплификации SSR-локуса AA200:

С – сорт 'Памяти Хангильдина'; 1–16 – мутантные популяции № 1–№ 16; М – маркер GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, фрагмент 200 пар нуклеотидов

Fig. 5. Electrophoretic patterns produced by amplification of the SSR locus AA200:

С – cv. 'Pamyati Khangildina'; 1–16 – mutant populations No. 1–No. 16; М – GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder, 200 bp fragment

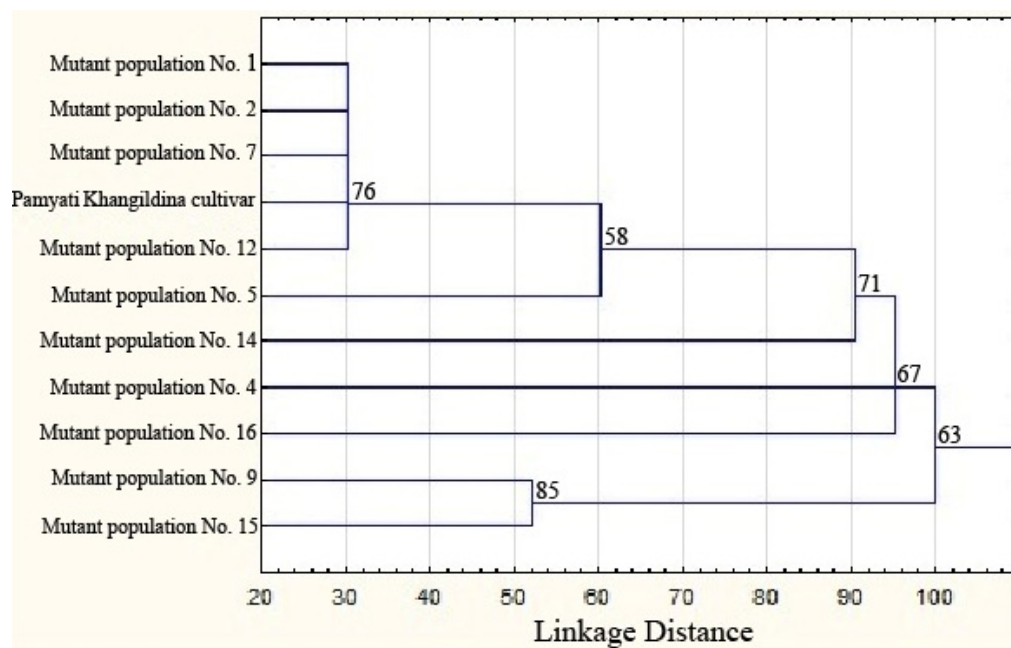


Рис. 6. Дендрограмма генетического сходства мутантных популяций гороха M_2 и сорта 'Памяти Хангильдина' на основе данных SSR-анализа (цифрами указаны значения бутстрепа, %)

Fig. 6. A dendrogram showing the genetic relationships among the M_2 pea mutant populations and cv. 'Pamyati Khangildina' based on the data of the SSR analysis (the numbers indicate the bootstrap values, %)

Обсуждение результатов

В результате опытов по получению мутантных форм гороха методом химически индуцированного мутагенеза было установлено, что длительность обработки семян азидом натрия оказывает большее влияние на прорастание, чем концентрация мутагена. При увеличении времени инкубирования семян с раствором NaN_3 до 9 ч и его концентрации до 5 мМ наблюдалось полное отсутствие всходов. Резкое падение всхожести семян при увеличении продолжительности воздействия мутагена свидетельствует о том, что время обработки является наиболее важным фактором для проникновения азид натрия в семена. В наших опытах оптимальными оказались варианты обработки, сочетающие наименьшее время инкубирования семян с азидом натрия (3 ч) и минимальную (1 мМ), среднюю (5 мМ) и максимальную (10 мМ) концентрацию NaN_3 , при которых были получены 13 мутантных растений гороха M_1 . В то время как при наибольшей продолжительности инкубирования (9 ч), даже при минимальной концентрации мутагена (1 мМ), сформировалось лишь 3 растения. Анализ литературных данных показывает, что при одинаковом времени воздействия (1–18 ч) одних и тех же концентраций азид натрия (1–10 мМ) на семена различных сортов гороха наблюдается разная степень снижения их всхожести (Sander, Muehlbauer, 1977; Kumar, 1988; Divanli-Türkan et al., 2006), поэтому условия обработки семян данным мутагеном следует подбирать эмпирическим путем для каждого сорта культурных растений индивидуально. Исследованный нами сорт 'Памяти Хангильдина' проявил относительно высокую чувствительность к азиду натрия.

В результате фенологических наблюдений и анализа элементов структуры урожая 16 мутантных популяций гороха M_2 были выявлены их отличия от исходного сорта 'Памяти Хангильдина' как по морфологическим (архитектоника листостебельной системы), так и по хозяйственно ценным признакам. Как известно, азид натрия ча-

сто используется в селекционной практике для повышения урожайности сельскохозяйственных культур (Spencer-Lopes et al., 2018). При использовании азид натрия в качестве химического мутагена нам удалось добиться увеличения у полученных мутантных популяций гороха озерненности бобов на 9,1–25,0%, числа семян с растения на 5,2–30,3%, массы семян с растения на 15,6–56,3%, массы 1000 семян на 0,6–26,1% по сравнению с сортом 'Памяти Хангильдина'.

SSR-анализ может применяться для оценки генетических изменений после химического мутагенеза. Например, этот метод был использован для оценки мутагенного воздействия кадмия (в течение 28 дней) на растения салата (Monteiro et al., 2009). Однако в этом эксперименте из 9 проанализированных SSR-маркеров полиморфизм был выявлен только для 1 локуса. R. Pilu et al. (2003) показали высокую эффективность микросателлитных маркеров для картирования мутации *lpa241* у кукурузы в результате обработки пыльцы этилметансульфонатом. Нами впервые был применен SSR-анализ для экспресс-оценки генетических изменений, индуцируемых азидом натрия у гороха. Исследование молекулярно-генетического полиморфизма мутантных популяций гороха M_2 и исходного сорта 'Памяти Хангильдина' показало, что все они обладают уникальным сочетанием аллелей по 9 из 10 изученных микросателлитных локусов. Это свидетельствует о различиях на генетическом уровне как между полученными мутантными популяциями, так и между каждой из них и сортом 'Памяти Хангильдина'. Наиболее эффективными для оценки генетического полиморфизма и идентификации изученных образцов гороха оказались SSR-маркеры AD61, AB28, AA5, D21, AD147, AB71, AA200 со значением PIC > 0,5.

Дендрограмма, построенная на основе данных микросателлитного анализа, позволила визуализировать особенности кластеризации мутантных популяций гороха M_2 и исходного сорта 'Памяти Хангильдина'. Было установлено, что наиболее продуктивные мутантные попу-

ляции № 9, № 15 и 16, превысившие сорт 'Памяти Хангильдина' по ряду хозяйственно ценных признаков, близки между собой, отличаясь от других образцов и по молекулярно-генетическим данным.

Заключение

Установлено, что концентрация раствора азидата натрия 5 мМ и выше в сочетании с длительностью инкубирования семян 9 ч и более для гороха сорта 'Памяти Хангильдина' является летальной. Обработка семян азидом натрия в концентрации 1 и 5 мМ в течение 3 ч позволяет получить мутантные популяции гороха с различными ценными признаками: скороспелостью, крупносемянностью, с высокой озерненностью бобов, семенной продуктивностью и числом семян с растения, характеризующиеся измененной архитектоникой листостебельной системы, обеспечивающей увеличение площади фотосинтезирующей поверхности листа и повышение устойчивости растений к полеганию. Это дает возможность рекомендовать определенные нами условия (критерии) обработки семян для применения в селекционной практике с целью получения мутантов с улучшенными хозяйственно ценными признаками.

SSR-анализ мутантных популяций гороха M_2 выявил их генетическую гетерогенность, что свидетельствует о высокой эффективности данного метода при оценке генетического полиморфизма мутантных растений, полученных путем обработки азидом натрия.

Новый исходный материал, созданный методом химически индуцированного мутагенеза, в дальнейшем планируется использовать в селекции гороха как источник ряда хозяйственно ценных признаков.

References / Литература

- Broertjes C., van Harten A.M. Applied mutation breeding for vegetatively propagated crops. *Developments in Crop Science*. 1988;12:197-204. DOI: 10.1007/BF00024972
- Davletov F.A. Breeding and production technology of pea in Bashkortostan (selektsiya i tekhnologiya proizvodstva gorokha v Bashkortostane). Ufa: Mir pechati; 2015. [in Russian] [Давлетов Ф.А. Селекция и технология производства гороха в Башкортостане. Уфа: Мир печати; 2015].
- Divanli-Türkan A., Khawar K.M., Özcan S. Effects of mutagenic sodium azide (NaN_3) on *in vitro* development of four pea (*Pisum sativum* L.) cultivars. *International Journal of Agriculture and Biology*. 2006;8(3):349-353. DOI: 1560-8530/2006/08-3-349-351
- Dzyubenko N.I. Vavilov strategy of collecting, maintaining and rational utilization of plant genetic resources of cultivated plants and their wild relatives. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2012;169:4-40. [in Russian] [Дзюбенко Н.И. Вавиловская стратегия пополнения, сохранения и рационального использования генетических ресурсов культурных растений и их диких родичей. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2012;169:4-40].
- Gainullina K.P., Kuluev B.R., Davletov F.A. Genetic diversity assessment in pea cultivars and lines using the SSR analysis. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2020;181(3):70-80. [in Russian] [Гайнуллина К.П., Кулуев Б.Р., Давлетов Ф.А. Оценка генетического разнообразия сортов и линий гороха с помощью SSR-анализа. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2020;181(3):70-80]. DOI: 10.30901/2227-8834-2020-3-70-80
- Jain S.M. *In vitro* mutagenesis for improving date palm (*Phoenix dactylifera* L.). *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2012;24(5):400-407.
- Jain S.M., Suprasanna P. Induced mutations for enhancing nutrition and food production. *Gene Conserve*. 2011;40:201-215.
- Kharkwal M.C., Shu Q.Y. The role of induced mutations in world food security. In: Q.Y. Shu (ed.). *Induced Plant Mutations in the Genomics Era*. Rome: FAO; 2009. p.33-38.
- Kleinhofs A., Warner R.L., Muehlbauer F.J., Nilan R.A. Induction and selection of specific gene mutations in *Hordeum* and *Pisum*. *Mutation Research*. 1978;51(1):29-35. DOI: 10.1016/0027-5107(78)90005-2
- Kumar S. Recessive monogenic mutation in grain pea (*Pisum sativum*) that causes pyridoxine requirement for growth and seed production. *Journal of Biosciences*. 1988;13(4):415-418.
- Lee M. Genome projects and gene pools: new germplasm for plant breeding? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(5):2001-2004. DOI: 10.1073/pnas.95.5.2001
- Makasheva R.Kh. Pea (Gorokh). Leningrad: Kolos; 1973. [in Russian] [Макашева Р.Х. Горох. Ленинград: Колос; 1973].
- Maluszynski M., Szarejko I., Bhatia C.R., Nichterlein K., Lagoda P.J.L. Methodologies for generating variability. In: S. Ceccarelli, E.P. Guimaraes, E. Weltzien (eds). *Plant Breeding and Farmers Participation*. Rome: FAO; 2009. p.159-194.
- Monteiro M.S., Lopes T., Mann R.M., Paiva C., Soares A.M.V.M., Santos C. Microsatellite instability in *Lactuca sativa* chronically exposed to cadmium. *Mutation Research*. 2009;672(2):90-94. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2008.10.012
- Pilu R., Panzeri D., Gavazzi G., Rasmussen S.K., Consonni G., Nielsen E. Phenotypic, genetic and molecular characterization of a maize low phytic acid mutant (*lpa241*). *Theoretical and Applied Genetics*. 2003;107(6):980-987. DOI: 10.1007/s00122-003-1316-y
- Sander C., Muehlbauer F.J. Mutagenic effects of sodium azide and gamma irradiation in *Pisum*. *Environmental and Experimental Botany*. 1977;17(1):43-47. DOI: 10.1016/0098-8472(77)90019-3
- Şen A., Sarsu F. Genetic diversity in sodium azide induced wheat mutants studied by SSR markers. *Trakya University Journal of Natural Sciences*. 2018;19(2):129-135. DOI: 10.23902/trkjnat.424305
- Spencer-Lopes M.M., Forster B.P., Jankuloski L. (eds). Manual on mutation breeding. Rome: FAO; Vienna: IAEA; 2018.
- Suprasanna P., Mirajkar S.J., Bhagwat S.G. Induced mutations and crop improvement. In: B. Bahadur, M.V. Rajam, S. Leela, K.V. Krishnamurthy (eds). *Plant Biology and Biotechnology. Vol. I. Plant Diversity, Organization, Function and Improvement*. New Delhi: Springer; 2015. p.593-617. DOI: 10.1007/978-81-322-2286-6
- Till B.J., Cooper J., Tai T.H., Colowit P., Greene E.A., Henikoff S. et al. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biology*. 2007;7(1):19. DOI: 10.1186/1471-2229-7-19
- Varshney R.K., Graner A., Sorrells M.E. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Trends in Biotechnology*. 2005;23(1):48-55. DOI: 10.1016/j.tibtech.2004.11.005
- Wannajindaporn A., Kativat C., Tantasawat P.A. Mutation induction of *Dendrobium* 'Earsakul' using sodium azide. *HortScience*. 2016;51(11):1363-1370. DOI: 10.21273/HORTSCI10860-16

Информация об авторах

Карина Петровна Гайнуллина, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение УФИЦ РАН, 450054 Россия, Уфа, пр. Октября, 71, Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение УФИЦ РАН, 450059 Россия, Уфа, ул. Р. Зорге, 19, karina28021985@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6246-1214>

Булат Разяпович Кулуев, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение УФИЦ РАН, 450054 Россия, Уфа, пр. Октября, 71, kuluev@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1564-164X>

Фирзинат Аглямич Давлетов, доктор сельскохозяйственных наук, главный научный сотрудник, Уфимский федеральный исследовательский центр Российской академии наук, Башкирский научно-исследовательский институт сельского хозяйства – обособленное структурное подразделение УФИЦ РАН, 450059 Россия, Уфа, ул. Р. Зорге, 19, davletovfa@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7421-869X>

Information about the authors

Karina P. Gainullina, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Genetics, a subdivision of the UFRC RAS, 71 Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russia, Bashkir Research Institute of Agriculture, a subdivision of the UFRC RAS, 19 R. Zorge St., Ufa 450059, Russia, karina28021985@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6246-1214>

Bulat R. Kuluev, Dr. Sci. (Biology), Leading Researcher, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Institute of Biochemistry and Genetics, a subdivision of the UFRC RAS, 71 Oktyabrya Ave., Ufa 450054, Russia, kuluev@bk.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1564-164X>

Firzinat A. Davletov, Dr. Sci. (Agriculture), Chief Researcher, Ufa Federal Research Center of the Russian Academy of Sciences, Bashkir Research Institute of Agriculture, a subdivision of the UFRC RAS, 19 R. Zorge St., Ufa 450059, Russia, davletovfa@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7421-869X>

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

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

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

Статья поступила в редакцию 28.01.2022; одобрена после рецензирования 05.04.2022; принята к публикации 06.09.2022
The article was submitted on 28.01.2022; approved after reviewing on 05.04.2022; accepted for publication on 06.09.2022