



## ПРИМЕНЕНИЕ ИНДУЦИРОВАННОГО МУТАГЕНЕЗА ДЛЯ УВЕЛИЧЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОЛИМОРФИЗМА ХЛОПЧАТНИКА

<sup>1</sup>Баймухаметова Э.А., <sup>2</sup>Лаштабова С.В., <sup>2</sup>Головина В.Ю., <sup>3</sup>Кимсанбаев О.Х., <sup>1,4</sup>Кулвев Б.Р.

<sup>1</sup>Башкирский государственный университет, Уфа, [elvina.baimuhametova@yandex.ru](mailto:elvina.baimuhametova@yandex.ru)

<sup>2</sup>Башкирский государственный педагогический университет, Уфа, [feuerstrom@mail.ru](mailto:feuerstrom@mail.ru)

<sup>3</sup>Волгоградский государственный аграрный университет, Волгоград, [newsbek@gmail.com](mailto:newsbek@gmail.com)

<sup>4</sup>Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, [kuluev@bk.ru](mailto:kuluev@bk.ru)

### Резюме

Хлопчатник (*Gossypium* L.) является одной из важнейших технических культур, имеющих стратегическое значение для всех стран мира, однако из-за суровых климатических условий в России он может возделываться только в самых южных регионах. В связи с этим, является актуальным выведение новых сортов этой культуры, способных давать урожай и в других климатических зонах нашей страны. Для увеличения скорости селекции и повышения генетического разнообразия хлопчатника могут быть использованы методы радиационного и химического мутагенеза. Одним из довольно широко используемых в селекции растений мутагенов является азид натрия, который сам или его метаболиты вызывают точечные мутации в геноме, не вызывающие сдвига рамки считывания генов. Нами была проведена экспериментальная работа по обработке семян хлопчатника раствором азид натрия в фосфатном буфере (рН 3). Данный мутаген в концентрации 1-5 мМ оказывал негативный эффект на всхожесть семян и на рост растений в начальный период развития. В то же время азид натрия в концентрации 10 мМ мало влиял на всхожесть семян и оказывал положительное действие на рост растений в начальный период развития. У части мутантных растений были выявлены аномалии развития листьев. Методами RAPD- и ISSR-анализа не удалось выявить генетический полиморфизм между растениями дикого типа и мутантными формами. Полученные данные свидетельствуют о целесообразности повышения концентрации азид натрия для обработки семян хлопчатника.

**Ключевые слова:** *Gossypium*, хлопчатник, индуцированный мутагенез, радиация, азид натрия, химический мутагенез, генетический полиморфизм, RAPD-анализ, ISSR-анализ

## APPLICATION OF INDUCED MUTAGENESIS FOR INCREASING THE GENETIC POLYMORPHISM OF COTTON

<sup>1</sup>Baimuhametova E.A., <sup>2</sup>Lashtabova S.V., <sup>2</sup>Golovina V.Y., <sup>3</sup>Kimsanbaev O.H., <sup>1,4</sup>Kuluev B.R.

<sup>1</sup>Bashkir State University, Ufa, [elvina.baimuhametova@yandex.ru](mailto:elvina.baimuhametova@yandex.ru)

<sup>2</sup>Bashkir State Pedagogical University, Ufa, [feuerstrom@mail.ru](mailto:feuerstrom@mail.ru)

<sup>3</sup>Volgograd State Agrarian University, Volgograd, [newsbek@gmail.com](mailto:newsbek@gmail.com)

<sup>4</sup>Institute of Biochemistry and Genetics of Ufa Scientific Center of RAS, Ufa, [kuluev@bk.ru](mailto:kuluev@bk.ru)

### Resume

Cotton (*Gossypium* L.) is one of the most important technical crops of strategic importance for all countries of the world, but due to severe climatic conditions in Russia it can be cultivated only in the southernmost regions. In this regard, it is important to bring out new varieties of this crop that can yield crops in other climatic zones of our country. To increase the speed of breeding and increase the genetic polymorphism of cotton, methods of radiation and chemical mutagenesis can be used. One of the rather widely used mutagens in plant breeding is sodium azide, which itself or its metabolites cause point mutations in the genome without causing frameshift mutations. We carried out an experimental work on treating cotton seeds with sodium azide solution in phosphate buffer (pH 3). This mutagen in a concentration of 1-5 mM had a negative effect on the seed germination and the plant growth in the initial period of development. At the same time, sodium azide at a concentration of 10 mM had little effect on seed germination and had a positive effect on plant growth during the initial period of development. Anomalies of leaf development

were detected in some mutant plants. The methods of RAPD and ISSR analysis failed to reveal genetic polymorphism between wild-type plants and mutant forms. The obtained data testify to the feasibility of increasing the concentration of sodium azide for the treatment of cotton seeds.

**Keywords:** *Gossypium*, cotton, induced mutagenesis, radiation, sodium azide, chemical mutagenesis, genetic polymorphism, RAPD analysis, ISSR analysis

### Введение

Одним из важнейших источников природного волокна на сегодняшний день является хлопчатник (*Gossypium*). Будучи самой распространенной прядильной культурой, он также выращивается для получения масел, кормовых белков, госсипола, а также хлопкового мёда. Сегодня в мире из хлопчатника получают свыше 80 видов продукции пищевого, оборонного, медицинского, химического, сельскохозяйственного и фармакологического назначения. Однако, выращивание хлопчатника в природных условиях России проблематично в связи с крайней требовательностью этой культуры к климатическим условиям и минеральному питанию. Приблизиться к решению данной проблемы могут помочь методы генной инженерии и геномного редактирования [Кулуев и др., 2017], имеющие большой потенциал для повышения эффективности сельскохозяйственного производства. Однако в нашей стране совершенно необоснованно коммерческое возделывание ГМО запрещено [Чемерис и др., 2014; 2015]. В связи с этим в России возрастает роль селекции, которая в нашей стране, прежде всего, должна быть направлена на получение новых сортов хлопчатника с сокращенным вегетационным периодом, высоким качеством волокна, а также устойчивым к негативным факторам внешней среды биотической и абиотической природы [Баймухаметова, 2016; Головина и др., 2017].

Важным инструментом селекции является мутагенез, который может быть вызван искусственно действием различных физических и химических факторов. В настоящее время индуцированный мутагенез широко используется для изменения генетического материала, например для получения анеуплоидов, гаплоидных форм растений и т.д., Данная технология может быть применена и для обеспечения генетического разнообразия и использования полученного материала для выведения новых сортов хлопчатника [Симонгулян и др., 1987]. В качестве физических мутагенных факторов эффективно применение радиационного облучения, позволяющего получить высокочастотные спонтанные мутации. Для этого целесообразно использовать гамма-лучи радиоактивного кобальта ( $^{60}\text{Co}$ ), цезия ( $^{137}\text{Cs}$ ), а также медленные и быстрые нейтроны.

Известно, что эффективным мутагенным фактором, индуцирующим структурные перестройки хромосом, а также вызывающим редкие типы мутаций, является облучение нейтронами, которые проводят на специальных ядерных реакторах или циклотронах. Облучению тепловыми нейтронами в дозах 15 – 35 Гр подвергаются семена, которые затем высеваются и исследуются на наличие мутаций. Было показано, что с увеличением дозы облучения повышается летальность как на стадии зародыша, так

и на ранних стадиях развития проростков. При этом выжившие растения резко отличаются от контрольных, не облученных, как фенотипически (измененный габитус куста, размеры листовой пластинки, цветков, деформированные маленькие коробочки), так и генотипически, что проявляется в возникновении в клетках мутаций, связанных с нехваткой целых хромосом, отдельных хромосомных плеч. Отличительной особенностью мутагенного эффекта тепловых нейтронов является индукция большого числа хромосомных aberrаций, заключающихся в появлении в растениях как геномных, так и хромосомных мутаций [Рахматуллина, Санамьян, 2007]. Причем тип хромосомной aberrации зависит от дозы облучения [Санамьян и др., 2016]. На сегодняшний день предполагается возможность применения нейтронного облучения для повышения всхожести семян, а также для повышения продуктивности растений. Так, было установлено, что под действием нейтронного облучения происходит улучшение показателей энергии прорастания и всхожести семян хлопчатника, однако, лишь при строгом соблюдении определенных условий и продолжительности выдерживания семян [Ходжаев, 2014]. Также изучались возможности применения в качестве мутагенов радиоактивных изотопов фосфора и серы. Имеются сведения, показывающие, что обработанные ими семена несли в себе мутации [Симонгулян и др., 1987].

В качестве мутагена возможно использование лазерного облучения, которое помимо обеззараживания, позволяет значительно расширить спектр генетических изменений и увеличить выход мутаций хлопчатника с множеством ценных признаков, исключая выход летальных форм [Хашимова, 2014]. Получение мутантных форм хлопчатника также возможно и путем опыления их облученной гамма-лучами пылью. Главным преимуществом данного метода является отсутствие в потомстве химерности, так как пыльца содержит одно генеративное ядро, поэтому мутация перейдет на все клетки растения, которое будет получено после оплодотворения облученной пылью. У полученных таким образом растений обнаруживаются геномные и структурные нарушения кариотипа, такие как моносомия и транслокации [Санамьян, 2016]. Использование моносомных линий значительно увеличивает эффективность получения высококачественных селекционных линий с замещением определенных хромосом [Санамьян, 2016].

Наиболее эффективным способом получения мутантных форм хлопчатника, с помощью физических факторов, является облучение семян гамма-лучами  $^{60}\text{Co}$ , которое позволяет получить наследуемую изменчивость отдельных признаков. Однако стоит отметить, что помимо положительных

фенотипических проявлений, таких как улучшение показателей длины и качества волокна, после облучения могут наблюдаться и отрицательные, например снижение выхода волокна, позднеспелость. Путем облучения семян хлопчатника гамма-лучами  $^{137}\text{Cs}$  в дозе 10 кРад был получен сорт средневолокнистого хлопчатника Байрам Хан, устойчивый к вертициллёзу, скороспелый и с высоким выходом хлопка-сырца. Методом радиационного мутагенеза с последующим использованием методов классической селекции созданы новые сорта хлопчатника комплексно устойчивые к стрессовым факторам среды, в том числе болезням и вредителям; новые формы жаро- и патогеноустойчивых экотипов; получены генотипы с минимальным накоплением радионуклидов, пестицидов, солей тяжелых металлов с высоким показателями агрохимической и энергетической эффективности [Мамедов, 2015]. Также были получены сорта скороспелые [Kandhro et al., 2002], устойчивые к засухе [Naziriv, 1979], и с повышенной урожайностью [Paterson, 2009].

Необходимо понимать, что для устойчивого воспроизведения результатов облучения следует учитывать качество семенного материала, режим облучения, пострадиационные условия. Так, на эффективность облучения сильно влияет температура до и после облучения (чем выше температура, тем ниже число мутаций), а также условия светового режима в пострадиационный период, а также тот факт, что сорта и виды хлопчатника имеют разную мутабельность и дают неодинаковый процент мутантных форм из общего числа облученных.

Одним из действенных методов селекции культурных растений, в том числе хлопчатника, на сегодняшний день является химический мутагенез. Этот метод зарекомендовал себя как успешный способ решения различных задач селекции, таких как увеличение генетической изменчивости и улучшение отдельных признаков сортов. Химические мутагены вызывают главным образом точковые мутации, то есть химические преобразования в локусах. Они не вызывают крупных хромосомных перестроек и поэтому менее отрицательно влияют на жизнеспособность организмов, чем радиация. У хлопчатника химические мутагены вызывают обширный спектр мутаций. В качестве химических мутагенов хлопчатника нашли широкое применение диазоацетилбутан (ДАБ), нитрозодиметилмочевина (НДММ), этиленимин (ЭИ), диметилсульфат (ДМС) [Тагиев, 2015].

Путем обработки семян ДМС были получены семена устойчивые к вертициллезному вилту [Gaibullaev et al., 1975]. Этилметилсульфонаты позволяют значительно улучшить качество волокна [Herring et al., 2004], повышают устойчивость к гербицидам [Jander, 2003]. Также для создания генетических вариаций хлопчатника используется колхицин [Luckett, 1989]. Этиленимин (азирин) индуцирует наиболее высокий выход мутаций по хозяйственно-ценным признакам [Patel, 2015].

Азид натрия ( $\text{NaN}_3$ ) широко используется для повышения урожайности сельскохозяйственных культур и улучшения их качественных характеристик, в том числе устойчивости к различным патогенам и

негативным факторам среды [Лаштабова и др., 2016]. Он вызывает появление точковых мутаций в геноме растений и таким образом приводит к продукции в них мутантного белка, отличного от природного [Khan, 2009; Srivastava et al., 2011]. Впервые азид натрия был использован в качестве мутагена при экспериментах на ячмене [Nilan et al., 1973]. Доказано, что эффективность мутаций находится в прямой зависимости от концентрации данного мутагена [Larik et al., 1983]. Азид натрия называют супер-мутагеном в связи с его высокой мутагенной эффективностью, близкой к 100%, наряду с его низкой токсичностью [Harten, 2007]. Азид натрия вызывает появление в геноме в небольших количествах хромосомных aberrаций. Под действием азид натрия не происходит сдвига рамки считывания, поэтому в клетках относительно редко происходит полное блокирование экспрессии генов. Однако при обработке азидом натрия может начать синтезироваться мутантный белок, несвойственный растению дикого типа. При этом биологические свойства этого белка могут быть схожи с природным [Bahadur et al., 2015]. Мутагенные свойства азид натрия проявляются благодаря его способности образовывать в клетках растений, особенно в кислой среде, органическое вещество, сходное с аминокислотами, - L-азидоаланин [ $\text{N}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$ ] [Gruszka, 2014]. Этот метаболит способен внедряться в ядро клетки, взаимодействовать там с ДНК, тем самым вызывая в ней мутации, преимущественно благодаря замене пуриновых оснований на пиримидиновые  $\text{A}\cdot\text{T}\rightarrow\text{G}\cdot\text{C}$  (транзиции), в редких случаях трансверсии  $\text{A}\cdot\text{T}\rightarrow\text{T}\cdot\text{A}$  [Olsen, 1993]. Физиологический эффект азид натрия проявляется в ингибировании электрон транспортных цепей. Так АТФ-азный комплекс чувствителен к действию азид натрия, что, в свою очередь, приводит к нарушению процесса синтеза АТФ и, как следствие, к нарушению синтеза РНК, ДНК и белков [Gruszka, 2014].

Для селекционеров наиболее доступными являются химические мутагены, из которых довольно эффективен и широко распространен азид натрия. Исходя из этого, нами было решено провести экспериментальную работу по обработке семян хлопчатника азидом натрия и получению мутантных растений. Целью нашей работы было определение оптимальной концентрации азид натрия для обработки семян и морфометрический анализ полученных мутантных растений. Также была поставлена задача изучить генетический полиморфизм мутантных и нативных форм хлопчатника методом RAPD- и ISSR-анализов.

### Материалы и методы

Для экспериментов по химически индуцированному мутагенезу хлопчатника использовали линии 1, 7, 10 и 75 вида *Gossypium hirsutum* L., полученные в Центре прикладной генетики, селекции и семеноводства хлопчатника при Волгоградском государственном аграрном университете. Семена хлопчатника предварительно замачивали в дистиллированной воде в течение 16 часов при температуре 37°C. Далее семена инкубировали в фосфатном буфере (рН 3) с

добавлением 1, 5 и 10 мМ  $\text{NaN}_3$  (азид натрия) в течение 4 часов при температуре 37°C. Семена контрольных растений инкубировали в фосфатном буфере без добавления азид натрия. После этого семена промывали проточной водопроводной водой в течение 20 минут и дистиллированной водой – 5 минут. Далее обработанные семена высевали в почву. Опыты по обработке семян азидом натрия и их высеву в почву были проведены 30 мая 2017 года в условиях необогреваемой теплицы на опытном участке Академгородка Уфимского научного центра РАН в черте г. Уфы. В вегетационный период проводили морфометрический анализ растений обработанных мутагеном и контрольных растений обработанных фосфатным буфером без добавления азид натрия. Морфометрический анализ заключался в измерении высоты стебля, ширины и длины трех самых крупных листьев. Выборка составила по 3 растения для каждого варианта опыта ( $n=3$ ). Измерения были проведены 11.07.17 г. (42 дня), 20.07.17 г. (51 дней) и 30.08.17 г. (92 дня).

Табл. 1.

Использованные RAPD- и ISSR-праймеры

Название праймера	Последовательность 5'→3'
AFK1	ACGGTGGACG
AFK3	GCGTCCATTC
LMBD	GGGCGCTG
OPAI-04	CTATCCTGCC
OPAI-05	GTCGTAGCGG
OPAB-08	GTTACGGACC
OPAC-14	GTCGGTTGTC
IS1	AGAGAGAGAGAGAGAGYGYG
IS3	GAGAGAGAGAGAGAGAC
DAC1	CACACACACACAT
DAC2	ACACACACACACG

Для генетического анализа у исследуемых растений хлопчатника были собраны и высушены листья. Тотальную ДНК из сухих листьев хлопчатника выделяли с использованием цетилтриметиламмоний бромид (СТАВ) [Rogers, Bendich, 1985]. Качество выделенной тотальной ДНК определяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. RAPD-анализ проводили с использованием универсальных праймеров AFK1, AFK3, LMBD, OPAI-04, OPAI-05, OPAB-08 и OPAC-14 последовательности которых приведены в таблице 1. В работе также были использованы 4 ISSR-праймера: IS1, IS3, DAC1 и DAC2 (табл. 1).

Реакционные смеси для RAPD- и ISSR-анализов объемом 30 мкл содержали следующие компоненты: 1 ед. Taq-полимеразы (“Евроген”, Россия), 3 мкл 10-кратного буфера Taq-полимеразы, 5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,25 мМ каждого dNTP, 90 пМ праймера, 0,2–0,5 мкг тотальной ДНК. Смесь покрывали 20 мкл минерального масла и оставляли для проведения реакции в термоциклере производства компании “ДНК-технология” (Россия) с использованием следующих протоколов. RAPD-анализ: начальная денатурация - 3 мин при 94°C; 35 циклов: денатурация при 94°C – 50 сек, температура отжига

35°C – 50 сек и элонгация при 72°C 1 мин 40 сек; заключительная элонгация 7 мин при 72°C. ISSR-анализ: начальная денатурация - 5 мин при 94°C; 35 циклов: денатурация при 94°C – 50 сек, температура отжига 53°C – 50 сек и элонгация при 72°C 1 мин 40 сек; заключительная элонгация 7 мин при 72°C. Полиморфизм RAPD- и ISSR-фрагментов определяли аналитическим электрофорезом в 1,5% агарозном геле. Агарозный гель-электрофорез проводили в приборах модели Sub-Cell GT WIDE MINI (“Bio-Rad Laboratories”, США). Гели фотографировали с помощью фотодокументационной системы Gel Camera System (“UVP”, Inc., США).

### Результаты исследования

#### Определение процента всхожести семян хлопчатника после обработки азидом натрия

Процент всхожести семян контрольных растений обработанных фосфатным буфером без добавления азид натрия составил 87% для линии 1 (табл. 2). При предварительной обработке семян азидом натрия в концентрации 1 и 5 мМ процент всхожести заметно уменьшался, например, для линии 1 до 51,7% (табл. 2). При обработке семян хлопчатника азидом натрия в концентрации 10 мМ процент всхожести, вопреки нашим ожиданиям, оказался, наоборот выше, и почти не уступал результатам контрольных растений (табл. 2). Более того, в случае с линией 2 при обработке семян 10 мМ раствором азид натрия процент всхожести был максимальным – 100% (табл. 2).

Табл. 2.

Расчет процента всхожести семян хлопчатника

№№ опыта	$\text{NaN}_3$ (мМ)	Исходное кол-во, шт.	Взошедшие семена, шт.	Всхожесть, %
1	0	30	26	87,0
1	1	29	15	51,7
1	5	28	15	53,6
75	1	33	25	75,8
75	5	34	23	67,6
2	10	30	30	100,0
7	10	30	24	80,0
10	10	30	22	73,0

Таким образом, по нашим данным можно было предполагать, что полулетальная доза азид натрия для семян хлопчатника составляет 1-5 мМ. Однако в свете наших данных о незначительном негативном влиянии 10 мМ раствора азид натрия на всхожесть семян, концентрация этого мутагена наверное может быть повышена до 20-40 мМ. Можно предположить, что для азид натрия весьма трудно определить полулетальную дозу, так как это вещество несмотря на свою высокую мутагенность имеет все же очень небольшую токсичность. Нельзя также исключать того, что азид натрия при определенных концентрациях может даже оказывать стимулирующее действие на всхожесть семян, как, к примеру, в случае с линией 2 (табл. 2). По крайней мере под действием нейтронного облучения, к примеру, происходит улучшение показателей энергии прорастания и всхожести семян хлопчатника [Ходжаев, 2014].

**Морфометрический анализ хлопчатников, полученных после обработки семян азидом натрия**

Обработанные азидом натрия семена хлопчатника высевались на почву и по истечении определенного времени оценивались различные параметры роста. На рис. 1 представлен морфометрический анализ высоты стебля анализируемых растений хлопчатника через 42, 51 и 92 дня после посева семян (рис. 1).

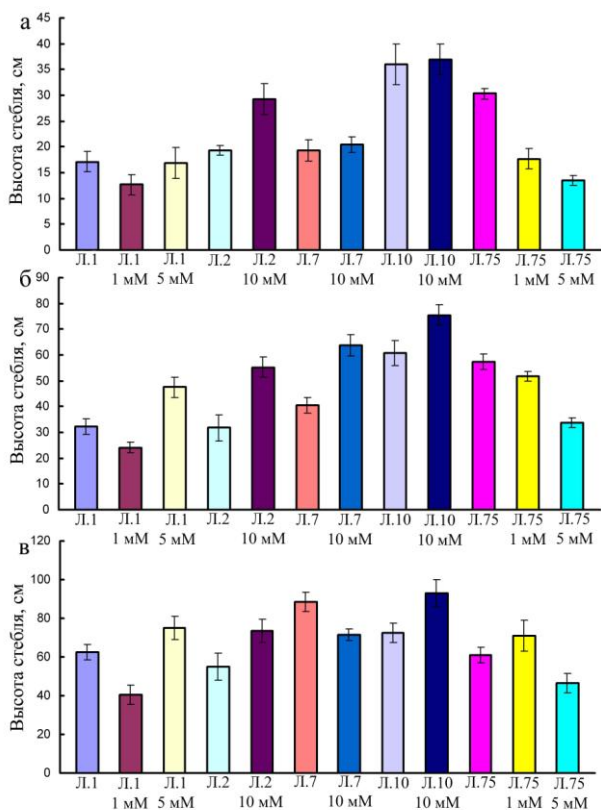


Рис. 1. Морфометрический анализ высоты стебля анализируемых растений хлопчатника: а – высота стебля через 42 дня после посева семян; б – высота стебля через 51 день после посева семян; в – высота стебля через 92 дня после посева семян. Л – линии 1, 2, 10 и 75 хлопчатника. 1, 5, 10 мМ – концентрация азиды натрия при обработке семян.

Образцы хлопчатника линий 1 и 75 были обработаны азидом натрия в концентрациях 1 и 5 мМ. Для растений линий 1 было характерно увеличение показателей высоты стебля при концентрации мутагена 5 мМ по отношению к контролю. Растения, обработанные раствором мутагена концентрации 1 мМ, показали обратный результат – через 92 дня после посева семян данный показатель был почти в 1,5 раза ниже, чем у контрольных образцов. Однако данная закономерность не наблюдалась для образцов линий 75. При первом измерении высоты стебля было выявлено уменьшение этого параметра у растений, обработанных как 1 мМ, так и 5 мМ мутагена (рис. 1а). В последующем негативное влияние мутагена наблюдалось только в растениях после обработки 5 мМ азиды натрия (рис. 1б, в). На 92-й день было выявлено незначительное увеличение высоты

стебля растений линии 75, обработанных азидом натрия в концентрации 1 мМ по отношению к контролю (рис. 1в). Вероятнее всего причиной выявленных различий была разная мутабельность исследуемых линий.

Семена линий 2, 7 и 10 обрабатывались мутагеном в концентрации 10 мМ. На 51 день наблюдалась заметная разница (10-20 см) между мутагенизированными и контрольными растениями хлопчатника. В целом, полученные после обработки мутагеном растения характеризовались улучшенными параметрами роста (рис. 4 и 5). Однако данная тенденция к 92 дню сохранилась только для линий 2 и 10. В целом к последнему этапу морфометрического анализа обработанные азидом натрия растения и контрольные растения большей частью выравнивались между собой по высоте стебля. Таким образом, на примере трех линий хлопчатника нами было показано стимулирующее действие обработки семян 10 мМ раствором азидом натрия на рост стебля в начальный период вегетации.

Также был проведен морфометрический анализ длины листьев анализируемых растений хлопчатника в тех же промежутках времени (рис. 2).

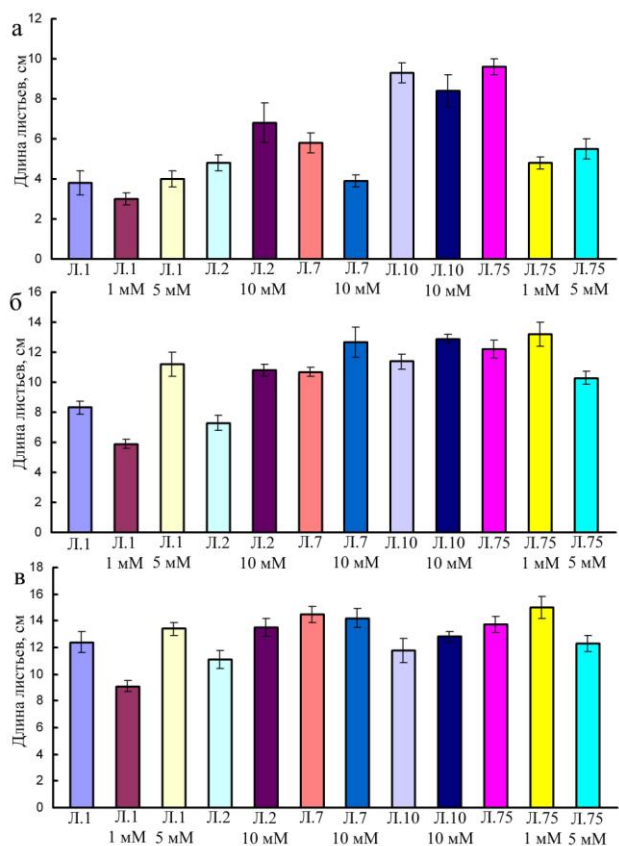


Рис. 2. Морфометрический анализ длины листьев анализируемых растений хлопчатника: а – длина листьев через 42 дня после посева семян; б – длина листьев через 51 день после посева семян; в – длина листьев через 92 дня после посева семян. Л – линии 1, 2, 10 и 75 хлопчатника. 1, 5, 10 мМ – концентрация азиды натрия при обработке семян.

Азид натрия в концентрации 1 и 5 мМ оказывал негативное влияние на рост листьев в начальные периоды вегетации (рис. 2а, б). К третьему измерению морфометрических параметров большинство анализируемых растений выравнивались по длине листьев (рис. 2в). Негативный эффект азид натрия в концентрации 10 мМ на длину листьев проявлялся в меньшей степени. Уже ко второму измерению контрольные и обработанные мутагеном растения сравнивались по исследуемому параметру (рис. 2б). Похожая картина была получена и при морфометрическом анализе ширины листьев анализируемых растений хлопчатника в те же промежутки времени (рис. 3).

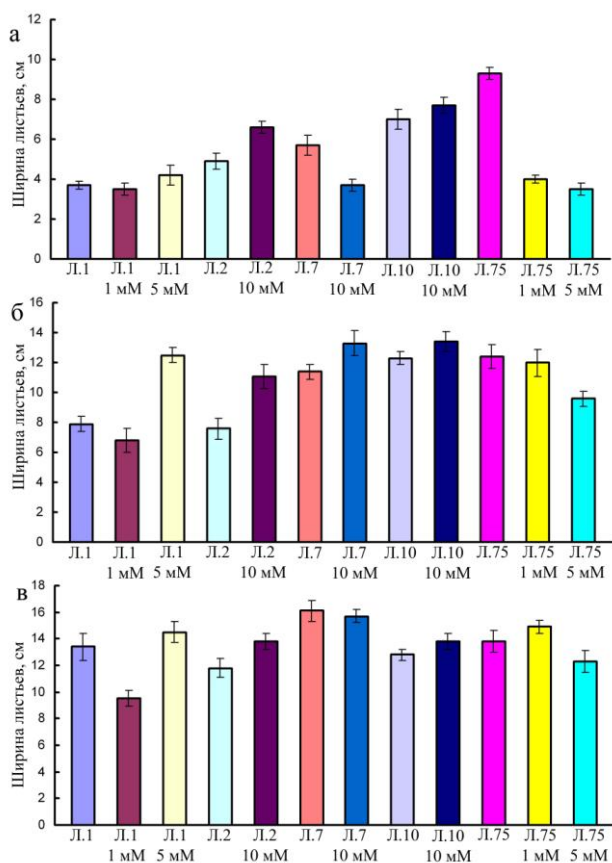


Рис. 3. Морфометрический анализ ширины листьев анализируемых растений хлопчатника:  
 а – ширина листьев через 42 дня после посева семян;  
 б – ширина листьев через 51 дней после посева семян;  
 в – ширина листьев через 92 дня после посева семян.  
 Л – линии 1, 2, 10 и 75 хлопчатника.  
 1, 5, 10 мМ – концентрация азид натрия при обработке семян.

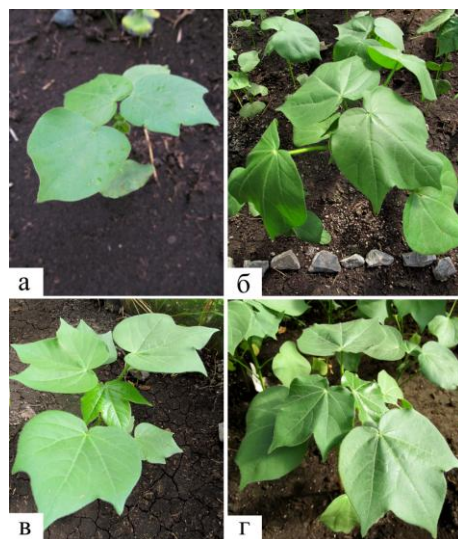


Рис. 4. Внешний вид растений хлопчатника линии 2:  
 а – контрольное растение линии 2, необработанное мутагеном, через 42 дня выращивания; б – обработанное мутагеном в концентрации 10 мМ растение хлопчатника через 42 дня выращивания; в – контрольное растение линии 2, необработанное мутагеном, через 51 день выращивания; г – обработанное мутагеном в концентрации 10 мМ растение хлопчатника через 51 день выращивания.

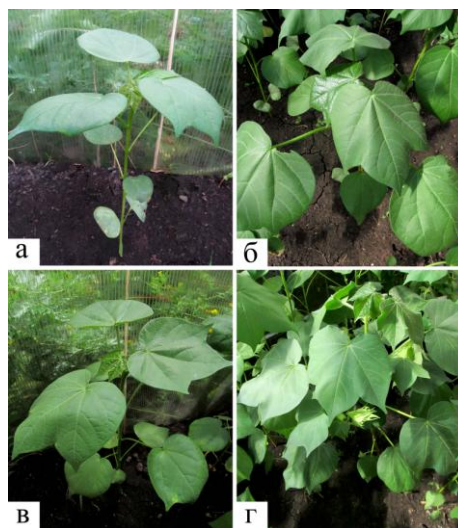


Рис. 5. Внешний вид растений хлопчатника линии 10:  
 а – контрольное растение, необработанное мутагеном, через 42 дня выращивания; б – обработанное мутагеном в концентрации 10 мМ растение хлопчатника через 42 дня выращивания; в – контрольное растение, необработанное мутагеном, через 51 день выращивания; г – обработанное мутагеном в концентрации 10 мМ растение хлопчатника через 51 день выращивания.

Параллельно с морфометрическим анализом проводилась оценка внешнего вида обработанных и контрольных растений линий 2 и 10 через 42 и 51 день после посева семян (рис. 4, 5). Растения линий 2 и 10, полученные после обработки семян 10 мМ раствором азид натрия, опережали контрольные растения в начальный период вегетации (рис. 4а, б, рис. 5а, б).

Однако в последующем контрольные и мутантные растения выравнивались по всем основным морфометрическим параметрам (рис. 4в, г, рис. 5в, г). В ходе работы также были выявлены растения с нарушениями развития листьев (рис. 6), тогда как среди контрольных растений таковые не обнаруживались. Вероятнее всего аномалии развития листьев были связаны с возникающими при обработке азидом натрия мутациями.

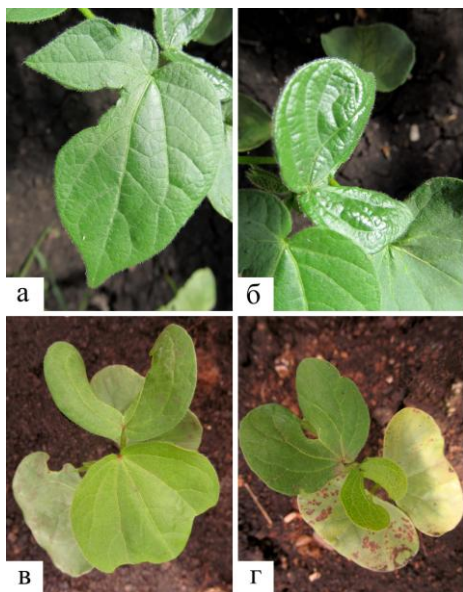


Рис. 6. Нарушения развития листовой пластинки у мутантных форм хлопчатника: а и б – хлопчатники линии 10, полученные из семян, обработанных 10 мМ раствором азиды натрия; в – хлопчатник линии 75, полученный после обработки семян 1 мМ раствором азиды натрия; г – хлопчатник линии 75, полученный после обработки семян 5 мМ раствором азиды натрия.

#### **RAPD- и ISSR-анализ мутантных форм хлопчатника**

Обработка растений азидом натрия используется для повышения генетического разнообразия, что является ценным материалом для последующей селекции. В связи с этим, представляет большой интерес выявление генетического полиморфизма полученных нами мутантных форм хлопчатника. Наиболее простым способом выявления мультилокусного полиморфизма ДНК могут служить методы случайного праймирования (RAPD-анализ) и микросателлитного праймирования (ISSR-анализ). Исходя из этого, нами была поставлена задача провести RAPD- и ISSR-анализ растений хлопчатника полученных после обработки семян азидом натрия в сравнении с контрольными растениями, полученными из семян обработанных фосфатным буфером без добавления мутагена.

Из сухих листьев двадцати растений хлопчатника (10 контрольных и 10 опытных растений) была выделена тотальная ДНК. В результате проведенного агарозного гель-электрофореза было показано, что СТАВ-методом выделяется высокомолекулярная и нефрагментированная ДНК хлопчатника, пригодная

для RAPD- и ISSR-анализа. При RAPD-анализе с праймером AFK1 в серии экспериментов выявлялось не менее шести четко различимых ампликонов, которые по размеру не отличались во всей анализируемой группе хлопчатников. RAPD-анализ с праймером AFK3 тотальной ДНК хлопчатника приводил к амплификации пяти локусов разного размера (рис. 7а). При этом среди двадцати образцов хлопчатника не удалось выявить ни одного полиморфного локуса. При использовании праймера OPAB-08 амплифицировалось семь фрагментов ДНК и также среди всей анализируемой группы хлопчатников полиморфные локусы не обнаруживались (рис. 7б). Полиморфизм в образцах анализируемых растений хлопчатника не выявлялся также при использовании RAPD-праймеров OPAI-04, OPAI-05 и OPAC-14.

При ISSR-анализе образцов хлопчатника также во всех экспериментах выявлялись четко различимые ампликоны, число которых в случае с праймером IS1 составило 6, IS3 – 6, DAC1 – 7 и DAC2 – 4 (рис. 7в, г). В то же время при использовании этих четырех ISSR-праймеров не было выявлено ни одного полиморфного локуса, который позволил бы говорить о возникшей генетической гетерогенности анализируемых растений хлопчатника.

Таким образом, нам при помощи методов RAPD-и ISSR-анализов не удалось выявить каких-либо различий как между разными линиями анализируемых растений хлопчатника, так и между подвергнутыми и не подвергнутыми мутагенезу растениями. Однако были обнаружены различия в морфологических параметрах хлопчатников разных линий (рис. 1-6). Также было показано, что обработка семян хлопчатника в 10 мМ растворе азиды натрия способствует улучшению основных параметров роста. Более того, только среди обработанных мутагеном растений хлопчатника были выявлены аномалии развития листьев (рис. 6). Вероятнее всего между анализируемыми группами растений хлопчатника все же имеются не только фенотипические, но и генотипические различия. Именно поэтому была поставлена задача попытаться оценить генетическую гетерогенность анализируемых растений хлопчатника. Однако с использованием выбранных для работы праймеров ни методом RAPD-анализа, ни методом ISSR-анализа нам не удалось выявить различий между обработанными и необработанными мутагеном растениями хлопчатника разных линий. В связи с полученными данными, можно предложить расширить список праймеров для последующих RAPD- и ISSR-анализов. Представляет определенный интерес также использование высокоразрешающих методов анализа длины фрагментов ДНК, полученных с помощью SSR- и других ДНК-маркеров. По нашему собственному опыту RAPD- и ISSR-анализы весьма эффективны для дифференциации разных видов растений внутри одного рода, тогда как для оценки внутривидового полиморфизма эти методы, возможно, подходят в меньшей степени.

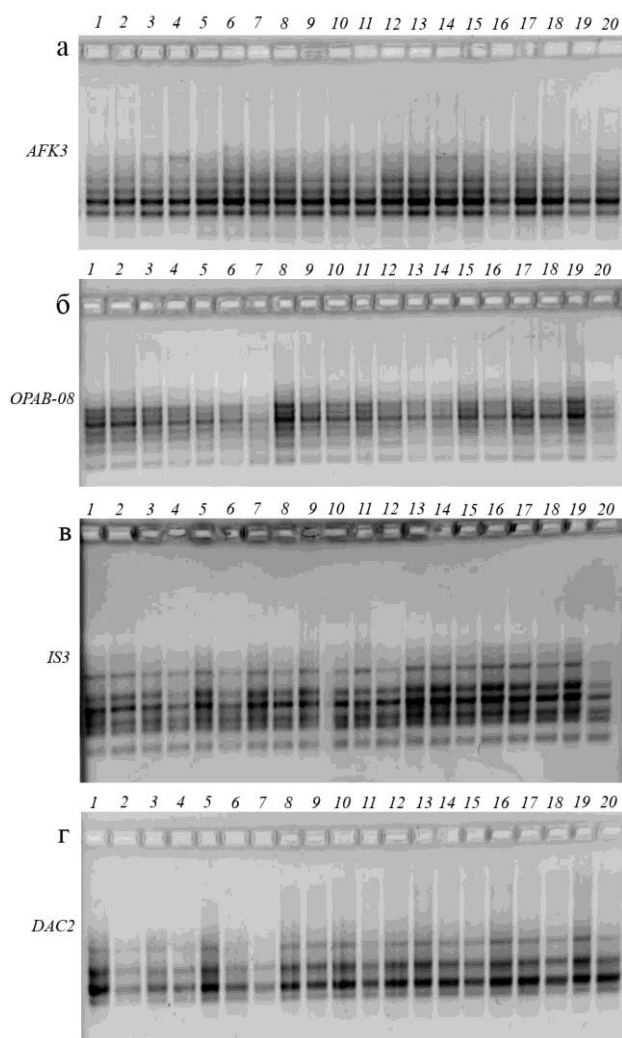


Рис. 7. Результаты RAPD- и ISSR-анализов хлопчатников разных линий, обработанных и необработанных азидом натрия: а – результаты RAPD-анализа с праймером AFK3; б – результаты RAPD-анализа с праймером OPAB-08; в – результаты ISSR-анализа с праймером IS3; г – результаты ISSR-анализа при помощи праймера DAC2. 1, 2 – линия 1 (дикий тип); 3 – линия 1 (1 мМ NaN<sub>3</sub>); 4 – линия 1 (5 мМ NaN<sub>3</sub>); 5, 6 – линия 2 (дикий тип); 7, 8 – линия 2 (10 мМ NaN<sub>3</sub>); 9, 10 – линия 7 (дикий тип); 11, 12 – линия 7 (10 мМ NaN<sub>3</sub>); 13, 14 – линия 10 (дикий тип); 15, 16 – линия 10 (10 мМ NaN<sub>3</sub>); 17, 18 – линия 75 (дикий тип); 19 – линия 75 (1 мМ NaN<sub>3</sub>); 20 – линия 75 (5 мМ NaN<sub>3</sub>).

#### Заключение

Для индуцированного мутагенеза культурных растений чаще всего используют радиацию и химические вещества. Для селекционеров наиболее доступно применение химических мутагенов, так как для их использования не требуется никакого оборудования. Более того, работы по химически индуцированному мутагенезу могут проводиться даже в полевых условиях. Одним из самых эффективных химических мутагенов является азид натрия, который не нарушает рамку считывания генов и поэтому способствует

появлению функциональных белков с новыми свойствами. В ходе проведенных нами исследований по применению азид натрия для мутагенизации хлопчатника выяснилось, что этот мутаген оказывает отрицательное влияние на всхожесть семян и рост растений при концентрации 1-5 мМ, тогда как при использовании 10 мМ был зафиксирован положительный эффект на данные параметры. Однозначного объяснения этим результатам нет, но исходя из наших данных, представляет большой интерес проведение в будущем экспериментов с более высокими концентрациями азид натрия. Судя по фенотипическому анализу, нам вероятнее всего удалось получить мутантные формы хлопчатника, однако методами RAPD- и ISSR-анализа мы не выявили генетического полиморфизма между разными группами анализируемых растений. В связи с этим для изучения генотипа полученных растений представляет интерес использование высокоразрешающих методов анализа длины фрагментов ДНК, полученных с помощью других ДНК-маркеров, например, SSR-анализа.

#### Литература

1. Баймухаметова Э.А. Хлопчатник: особенности культуры, перспективы создания трансгенных отечественных сортов и их выращивания в России // Биомика. 2016. Т. 8. №3. С. 275–288 [Baimuhametova E.A. Cotton: features of culture, perspectives of producing a transgenic Russian grades, and breeding in Russia // Biomics. 2016. V.8. P. 275–288. In Russian].
2. Головина В.Ю., Лаштабова С.В., Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р. Методы генетической трансформации хлопчатника // Биомика. Т.9. №1. 2017. С. 42-47. [Golovina V.Y., Lashtabova S.V., Mikhaylova E.V., Kuluev B.R. Methods of cotton genetic transformation // Biomics. 2017. V.9. P. 42–47. In Russian].
3. Кулуев Б.Р., Геращенко Г.А., Рожнова Н.А., Баймиев Ан.Х., Вершинина З.Р., Князев А.В., Матниязов Р.Т., Ясыбаева Г.Р., Никоноров Ю.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. CRISPR/Cas редактирование геномов растений // Биомика. 2017. Т. 9. №3. С. 155–182. [Kuluev B.R., Gerashchenkov G.A., Rozhnova N.A., Baymiev An.Kh., Vershinina Z.R., Knyazev A.V., Matniyazov R.T., Gumerova G.R., Mikhailova E.V., Nikonorov Yu.M., Chemeris D.A., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. CRISPR/Cas genome editing of plants // Biomics. 2017. V. 9. №3. P. 155–182. In Russian].
4. Лаштабова С.В., Головина В.Ю., Михайлова Е.В., Кулуев Б.Р. Применение азид натрия для химического индуцированного мутагенеза культурных растений // Биомика. Т.9. №1. 2017. С. 48-54. [Lashtabova S.V., Golovina V.Y., Mikhaylova E.V., Kuluev B.R. Using of sodium for chemical induced mutagenesis of crop plants // Biomics. 2017. V.9. P. 48–54. In Russian].
5. Мамедова Н.Х., Шихлинский Г.М. Фитопатологическая устойчивость к *Verticillium dahliae* мутантов и гибридов хлопчатника // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их



- использования. 2015. С. 339–342. [Mamedova N.Kh., Shikhlinский G.M. Phytopathological resistance to *Verticillium dahliae* mutants and cotton hybrids // *Novye i netraditsionnye rasteniya i perspektivy ikh ispol'zovaniya*. 2015. P. 339–342. In Russian]. doi:632.484:633.511
6. Рахматуллина Э.М., Санамьян М.Ф. Оценка эффективности облучения семян тепловыми нейтронами для индукции аббераций хромосом у хлопчатника *Gossypium hirsutum* L. в M<sub>1</sub> // *Генетика*. 2007. Т. 43. С. 499–507 [Rakhmatullina E.M., Sanam'yan M.F. Estimation of the effectiveness of irradiation of seeds by thermal neutrons for the induction of aberrations of chromosomes in cotton *Gossypium hirsutum* L. in M<sub>1</sub> // *Genetika*. 2007. T. 43. P. 499–507. In Russian]. doi:576.312.3:633.511
7. Санамьян М.Ф. Цитогенетический эффект обработки семян хлопчатника тепловыми нейтронами // *Цитология и генетика*. 2007. № 3. С. 49–54. [Sanam'yan M.F. Cytogenetic effect of cotton seed treatment with thermal neutrons // *Tsitologiya i genetika*. 2003. № 3. P. 49–54. In Russian]. doi:633.511:576.312.3
8. Санамьян М.Ф., Бобохужаев Ш.У., Макамов А.Х., Ачилов С.Г., Абдурахмонов И.Ю. Создание новой серии анеуплоидных линий у хлопчатника (*Gossypium hirsutum* L.) с идентификацией отдельных хромосом с помощью транслокационных и SSR-маркеров // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016. Т. 20. С. 643–652. [Sanam'yan M.F., Bobokhuzhaev Sh.U., Makamov A.Kh., Achilov S.G., Abdurakhmonov I.Yu. The creation of new aneuploid lines of the cotton (*Gossypium hirsutum*L.) with identification of chromosomes by translocation and SSR markers // *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii*. 2016. T. 20. P. 643–652. In Russian]. doi:10.18699/VJ16.186
9. Симонгулян Н.Г., Мухамедханов С.Р. Генетика, селекция и семеноводство хлопчатника // *Ташкент: Мехнат*, 1987. 320 с. [Simongulyan N.G., Mukhamedkhanov S.R. Cotton genetics, selection and seed production/ *Tashkent: Mekhnat*, 1987. 320 p. In Russian]
10. Тагиев А.А. Химический мутагенез и создание исходного материала в селекции хлопчатника / *Научные связи*. 2014. С. 70–75 [Tagiev A.A. Chemical mutagenesis and parent material development in cotton breeding // *Nauchnye svyazi*. 2014. S. 70–75. In Russian]. doi:631.523.575.631.51
11. Хашимова Н.Р., Ахунов А.А., Автономов В.А., Ларина Л.А. Влияние солей глицирризиновой кислоты на активность ферментов каллусных культур хлопчатника при воздействии *Verticillium dahliae*// *Вавиловские чтения*, 2014. С. 380 [Khashimova N.R., Akhunov A.A., Avtonomov V.A., Larina L.A. The effect of glycyrrhizic acid salts on the activity of the enzymes of callus cultures of cotton with the result *Verticillium dahliae* // *Vavilovskie chteniya*, 2014. 380 p. In Russian]. doi:577.124.5:633.511
12. Ходжаев Т.А. Повышение посевных качеств семян хлопчатника под действием нейтронного облучения // *Известия ВУЗов Кыргызстана*. 2015. № 9. С. 12–14. [Khodzhaev T.A. Increase of sowing guiltest of seeds of cotton under the influence of neutron radiation // *Izvestiya VUZov Kyrgyzstana*. 2015. № 9. P. 12–14. In Russian]. doi:635.1/8(035)/42
13. Чемерис А.В., Бикбулатова С.М., Чемерис Д.А., Баймиев Ал.Х., Князев А.В., Кулуев Б.Р., Максимов И.В. Надо ли опасаться ГМО? Взгляд несторонних наблюдателей на истерию вокруг // *Биомика*. 2014. Т.6. № 2. С. 77–138. [Chemeris A.V., Bikbulatova S.M., Chemeris D.A., Baymiev A.L., Knyazev A.V., Kuluev B.R., Maksimov I.V. Should beware of the GMOs? On-site observers view on the hysteria around // *Biomics*. 2014. V.6. № 2. P. 77–138. In Russian].
14. Чемерис А.В., Чемерис Д.А., Баймиев А.Х., Князев А.В., Кулуев Б.Р., Максимов И.В. Борьба с ГМО как неолысенковщина // *Биомика*. 2015. Т. 7. № 1. С. 1–39. [Chemeris A.V., Chemeris D.A., Baymiev A.Kh., Knyazev A.V., Kuluev B.R., Maksimov I.V. The fight against GMO is neolysenkoism // *Biomics*. V. 7. № 1. P. 1–39. In Russian].
15. Bahadur B., Venkat Rajam M., Sahijram Leela, Krishnamurthy K.V. Induced mutations and crop improvement *Plant Biology and Biotechnology* // Springer. India. 2015. V. 1. P. 593–617.
16. Gaibullaev I.Kh., Avazkhodzhaev M.Kh., Egamberdiev A.E. Reaction of chemomutants of cotton to infection by the pathogen of *Verticillium wilt* // *Soviet Genetics*. 1975. V. 11. P. 27–34.
17. Gruszka D., Szarejko I., Maluszynsk M. Sodium azide as a mutagen // *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. 2012. P. 159–166. doi:10.13140/2.1.2105.8560
18. Harten A. M. *Mutation breeding* / Cambridge University Press. 2007. 343 p.
19. Herring A.D., Auld D.L., Ethridge M.D., Hequet E.F., Bechere E., Green C.J., Cantrell R.D. Inheritance of fiber quality and lint yield in a chemically mutated population of cotton // *Euphytica*. 2004. V. 136. P. 333–339. doi:10.1023/B:EUPH.0000032747.97343.54
20. Jander G., Baerson S., Hudak J.A., Gonzalez K.A., Gruys K.J., Robert L. Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determine frequency of herbicide resistance // *Plant Physiology*. 2003. V. 131. P. 139–146. doi:10.1104.102.010397
21. Kandhrov M.M., Mahboob S.L., Ghulam A.S., Nizamani S. Performance of early maturing strains of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) developed through induced mutation and hybridization // *Asian Journal of Plant Sciences*. 2002. V. 1. P. 581–582.
22. Khan S., Fahad A., Firoz A. Sodium azide: a chemical mutagen for enhancement of agronomic traits of crop plants // *Int. J. Environ. Sci. Tech*. 2009. V. 4. P. 1–21. doi: 10.1.1.465.4582
23. Larik A.S., Hafiz H.M.I., Al-Saheal Y.A. Azide mutagenesis in cotton (*Gossypium hirsutum*) // *Sci. Environ*. 1983. V. 17. P. 118–125.
24. Lockett D.J. Colchicine mutagenesis is associated with substantial heritable variation in cotton// *Euphytica*. 1989. V. 42. P. 177–182.
25. Nazirov N.N., Satipov G. Reaction of radiation-induced cotton mutants to different water regimes // *Soviet Agricultural Sciences*. 1979. V. 3. P. 52–63.

26. Nilan R. A., Awan M. A., Konzak C. F., Rutger J. N. Mutagenic effect of sodium azide in rice // *Crop Science*. 1980. V. 20. P. 663–668. doi:10.2135/1980.0011183
27. Olsen O., Wang X., Wettstein D. Sodium azide mutagenesis: preferential generation of AT → GC transitions in the barley *Ant18* gene // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993. V. 90. P. 8043–8047.
28. Patel J.D., Wright R.J., Auld D., Chandnani R., Goff V.H., Ingles J., Pierce G.J., Torres M. J., Paterson A.H. Alleles conferring improved fiber quality from EMS mutagenesis of elite cotton genotypes // *Theoretical and Applied Genetics*. 2014. V. 127. P. 821–830. doi: 10.1007/s00122-013-2259-6
29. Paterson A. Genetics and genomics of cotton. *Plant genetics and Genomics: Crops and Models*. 2009. P. 567. doi:10.1007/978-0-387-70810-2
30. Rogers S.O., Bendich A.J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues. *Plant Mol. Biol.* 1985. V. 5. P. 69–76. doi:10.1007/BF00020088
31. 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.) // *Asian Journal of Plant Sciences*. 2011. V. 10. P. 190–201. doi:10.3923/2011.190.201