

ИЗУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ  
ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ

Научная статья

УДК 633.12:577:21:631.524.84

DOI: 10.30901/2227-8834-2025-4-9-18

Генетическая изменчивость и полевая оценка растений  
*Fagopyrum esculentum* Moench, полученных *in vitro*  
с использованием мутагенных сред

С. А. Боровая, А. Г. Клыков

Федеральный научный центр агrobiотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки, Уссурийск, Россия

Автор, ответственный за переписку: Светлана Александровна Боровая, borovayasveta@mail.ru

**Актуальность.** Получение исходного материала для селекции гречихи является важным направлением исследований. Использование тяжелых металлов как мутагенного фактора *in vitro* обуславливает возникновение генетической изменчивости у исходных образцов гречихи, способствуя расширению пула перспективных генотипов.

**Материалы и методы.** Материалом для исследований гречихи послужил сорт 'Изумруд'. Регенеранты гречихи получены *in vitro* на мутагенных средах с ионами цинка (184–299 мг/л) и минеральным голоданием в лаборатории селекционно-генетических исследований полевых культур ФНЦ агrobiотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки. Генетическую изменчивость образцов исследовали с помощью четырех ISSR-маркеров (M1, M2, M7, M11). Контроль – сорт 'Изумруд'. Полевую оценку растений проводили по основным хозяйственно ценным признакам.

**Результаты.** Получены регенерантные образцы R 1069, R 1070, R 1071 – источники хозяйственно ценных признаков, генетически отличающиеся от исходной формы. В экстремальных метеорологических условиях, связанных с сильным переувлажнением почвы, по сравнению с сортом-стандартом, помимо лучших морфологических показателей, они показали достоверное увеличение продуктивности одного растения в 1,8–2,2 раза. R 1069, помимо высокой продуктивности, выделился по содержанию белка (11,98%).

**Заключение.** Мутагенные среды с ионами цинка и минеральным голоданием *in vitro* индуцируют генетическую изменчивость у исходного сорта гречихи, что приводит к получению генотипов с улучшенными показателями хозяйственно ценных признаков. Генетические отличия от исходной формы подтверждены ISSR-маркерами M1, M2, M7 и M11. Регенерантные образцы R 1069, R 1070, R 1071 являются перспективным исходным материалом для селекции.

**Ключевые слова:** гречиха, регенерированные растения, ионы цинка, минеральное голодание, хозяйственно ценные признаки

**Благодарности:** работа выполнена в рамках государственного задания согласно тематическому плану НИР по теме № FNGW-2022-0007 «Оценить генетическое, морфофизиологическое и биоценотическое разнообразие основных сельскохозяйственных культур, их иммунологические механизмы к вредителям и патогенам, а также факторы вирулентности».

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

**Для цитирования:** Боровая С.А., Клыков А.Г. Генетическая изменчивость и полевая оценка растений *Fagopyrum esculentum* Moench, полученных *in vitro* с использованием мутагенных сред. Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции. 2025;186(4):9-18. DOI: 10.30901/2227-8834-2025-4-9-18

## STUDYING AND UTILIZATION OF PLANT GENETIC RESOURCES

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2025-4-9-18

### Genetic variation and field evaluation of buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench) obtained *in vitro* with the use of mutagenic media

Svetlana A. Borovaya, Alexey G. Klykov

Federal Scientific Center of Agricultural Biotechnology of the Far East named after A.K. Chaika, Ussuriysk, Russia

**Corresponding author:** Svetlana A. Borovaya, borovayasveta@mail.ru

**Background.** Obtaining starting material for buckwheat breeding is an important task of the breeding process. Heavy metals used *in vitro* as mutagenic factors induce genetic variation in buckwheat germplasm sources and expand the pool of promising genotypes with important agronomic traits.

**Materials and methods.** Regenerated buckwheat plants were grown *in vitro* on MS mutagenic media with zinc ions (184–299 mg/L) and under mineral starvation in the Laboratory of Breeding and Genetic Research on Field Crops at the Federal Scientific Center of Agricultural Biotechnology of the Far East named after A.K. Chaika. Genetic variation of the accessions was studied with four ISSR-markers (M1, M2, M7, and M11). Cv. 'Izumrud' served as the control. Field evaluation of buckwheat plants was performed to assess their main agronomic characters.

**Results.** Regenerated buckwheat accessions R 1069, R 1070 and R 1071 possessed valuable agronomic traits and were genetically different from the original form. Under extreme meteorological conditions, associated with waterlogging of the soil, they showed a statistically significant and valid increase in productivity per plant (1.8–2.2 times) and higher values of morphological indicators compared to the control. Accession R 1069 combined high protein content (11.98%) with high productivity.

**Conclusion.** Mutagenic media with zinc ions and mineral starvation *in vitro* induced genetic variation in the source cultivar of buckwheat, leading to the emergence of genotypes with improved morphological and agronomic traits. Genetic differences from the original form were confirmed with ISSR markers M1, M2, M7, and M11. The regenerated buckwheat accessions (R 1069, R 1070, and R 1071) may be recommended as promising starting material for breeding.

**Keywords:** buckwheat, regenerated plants, zinc ions, mineral starvation, important agronomic traits

**Acknowledgements:** the research was performed within the framework of the state task according to Theme No. FNGW-2022-0007 "To evaluate the genetic, morphophysiological and biocenotic diversity of main agricultural crops, their immunological mechanisms against pests and pathogens, and virulence factors".

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

**For citation:** Borovaya S.A., Klykov A.G. Genetic variation and field evaluation of buckwheat plants (*Fagopyrum esculentum* Moench) obtained *in vitro* with the use of mutagenic media. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2025;186(4):9-18. (In Russ.). DOI: 10.30901/2227-8834-2025-4-9-18

## Введение

Гречиха посевная (*Fagopyrum esculentum* Moench) – важная продовольственная крупяная культура. Благодаря хорошим питательным свойствам гречневой крупы, интерес к ее потреблению, в том числе в качестве функционального продукта питания, в последнее время возрастает. Сбалансированный аминокислотный профиль белка плодов и биоактивные флавоноиды повышают востребованность *F. esculentum*. Кроме этого, высокая пластичность и способность к быстрой адаптации позволяют возделывать ее в различных почвенно-климатических условиях. Например, в горных районах – до высоты 2600 м н. у. м. гречиха хорошо растет, развивается и дает высокий урожай (Rakhmikhudoev, 2000). Однако, несмотря на ценные свойства культуры, урожайность ее остается низкой – на уровне 10 ц/га. Заметных достижений в области повышения продуктивности культуры методами традиционной селекции достигнуто не было вследствие ряда ее биологических особенностей – длительности роста и цветения, недружного созревания плодов. Использование биотехнологических приемов и индуцированного мутагенеза в селекционной работе с *F. esculentum* может стать действенным инструментом получения генетической изменчивости у растительных образцов и появления у них хозяйственно ценных признаков, в первую очередь повышенной продуктивности.

Биотехнологические методы нашли широкое применение в программах селекции гречихи. Они используются как для размножения ценных генотипов, так и в целях получения новых форм (Suvorova, 2016; Barsukova et al., 2019). Мутагенез *in vitro* – перспективный способ создания генетически нового исходного материала (Viana et al., 2019; Butovets et al., 2024). К группе особо опасных химических токсикантов относятся тяжелые металлы. Они вызывают необратимые конформационные изменения макромолекул (нуклеиновых кислот, белков) и, соответственно, изменение скорости процессов метаболизма и синтеза, воздействуют на ферменты (ингибирование или активация) и способствуют возникновению мутаций (Kolyasnikova, 2019). Это может быть применено в мутационной селекции *F. esculentum*, в том числе *in vitro*. Так, при создании сорта гречихи посевной ‘Уссулочка’ в гибридизации использовали регенеранты, полученные с помощью ионов меди (Klykov, Barsukova, 2021). Цинк является эссенциальным микроэлементом для растений. Это кофактор для более чем 300 ферментов и 200 транскрипционных факторов, связанных с поддержанием целостности мембраны, метаболизмом ауксинов и репродукцией (Singh et al., 2016). Однако в избыточных количествах он оказывает негативное воздействие на клеточный метаболизм и дестабилизирует биосинтетические процессы (Zlobin, 2015). Генотоксическое действие ионов цинка – увеличение частоты абберантных клеток и повреждение ДНК – установлено многими авторами (Ul'yanenko et al., 2017; Üstündağ et al., 2024). Так, обработка цинком семян кукурузы оказывала сильный антимитотический эффект (увеличение процента отставания хромосом, мультиполярных анафаз, К-митозов) (Erturk et al., 2015). При этом отмечено, что по способности индуцировать хромосомные абберации в рейтинге солей тяжелых металлов цинк занимает первое место среди многих тяжелых металлов:  $\text{ZnSO}_4 > \text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 > \text{Al}(\text{NO}_3)_3 = \text{NiSO}_4 > \text{CdCl}_2 > \text{CuSO}_4$  (Ul'yanenko et al., 2017).

Значительный природный стрессовый фактор для растений – дефицит элементов минерального питания, в первую очередь макроэлементов, входящих в состав ДНК, РНК и фотосинтетических пигментов (азот, фосфор, сера). При их дефиците у растений может развиваться приспособленность к данному стрессу, в том числе на генетическом уровне (Zhang et al., 2019). По некоторым данным, голодание вызывает мутационное воздействие на генетический аппарат живых организмов (Harbison et al., 2005). В связи с вышесказанным представляется перспективным использование *in vitro* тяжелого металла цинка и минерального голодания в качестве мутагенных факторов, которые могут индуцировать появление новых признаков и свойств у исходных генотипов гречихи.

Для быстрого выявления генетических изменений в селекции применяют различные молекулярно-генетические маркеры. Маркеры межмикросателлитной последовательности (ISSR) успешно используются для исследования генетического разнообразия растений вследствие их высокой информативности, в том числе при работе с гречихой (Kadyrova et al., 2010; Sabreena, et al., 2021). Полученные с их помощью паттерны ПЦР-продуктов сортоспецифичны, стабильны и воспроизводимы. С использованием данных маркеров была изучена генетическая изменчивость гречихи посевной, что позволило повысить результативность отбора перспективных линий и показало эффективность применяемой маркерной системы (Klykov, Barsukova, 2021). Г. Д. Кадыровой и др. (Kadyrova et al., 2010) выявлено, что наиболее полиморфными при исследовании генетического разнообразия сортов *F. esculentum* оказались маркеры M1 ((AC)8GC), M2 ((AC)8CTG), M7 ((CAG)5) и M11 ((CA)6AG).

Целью настоящей работы являлась оценка генетической изменчивости регенерантных образцов гречихи, полученных с использованием селективных сред с цинком и минеральным голоданием, с помощью ISSR-маркеров и в полевых условиях по хозяйственно ценным признакам.

## Материалы и методы

### Материалы и ISSR-анализ

Исходным материалом для создания регенерантных образцов гречихи являлся сорт гречихи посевной ‘Изумруд’ селекции ФНЦ агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки (ФНЦ агробиотехнологий). Регенеранты получены в 2019–2021 гг. на питательных средах MS с добавлением соли  $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$  (кристаллогидрат) в следующих количествах по вариантам опыта: 808, 909, 1010, 1111, 1212 и 1313 мг/л, что соответствует 184, 207, 230, 256, 276 и 299 мг/л  $\text{Zn}^{2+}$  (шаг эксперимента – 23 мг/л). Число пробирок по каждому варианту – 20. Для моделирования минерального голодания использовали среду MS с минеральными микросолями без добавления макросолей (Borovaya et al., 2023). Для пассажа использовали одноузловые микрочеренки (2–3 нижних междоузлия), которые культивировали *in vitro* в течение 21 суток с цинком по вариантам опыта, а выжившие растения черенковали на среду MS без макросолей и культивировали в течение 40 дней. Объектами дальнейших исследований явились выжившие образцы (минеральное голодание – 6 шт., 184 мг/л  $\text{Zn}^{2+}$  – 7 шт., 207 мг/л  $\text{Zn}^{2+}$  – 7 шт., 230 мг/л  $\text{Zn}^{2+}$  – 4 шт., 256 мг/л  $\text{Zn}^{2+}$  – 3 шт., 276 мг/л  $\text{Zn}^{2+}$  – 5 шт., 299 мг/л  $\text{Zn}^{2+}$  – 4 шт.) и сорт ‘Изумруд’ (3 шт.).

Тотальную ДНК выделяли из свежих листьев с каждого образца у 14-дневных проростков солевым мето-

дом (Aljanabi, Martinez, 1997) с дополнительным шагом очистки экстракта смесью хлороформ/изоамиловый спирт (24/1). Оценку качества ДНК осуществляли с помощью электрофореза в 1-процентном агарозном геле, в качестве стандарта для определения молекулярного веса использовали ДНК фага  $\lambda$  известной концентрации. Концентрацию ДНК определяли на флуориметре MaxLife. ПЦР проводили в 3-кратной повторности с использованием четырех ISSR-праймеров M1, M2, M7 и M11 (табл. 1) (Kadyrova et al., 2010) в объеме 10 мкл, с применением готовой 2X-реакционной смеси BioMaster HS-Taq ПЦР-Color («Биолабмикс») в термоциклере BioRad T100 Thermal Cycler.

**Таблица 1. Характеристика используемых ISSR-праймеров**  
**Table 1. Characteristics of the used ISSR-primers**

Шифр праймера	Последовательность, 3'-5'	Температура отжига, °C	Концентрация $MgCl_2$ , mM
M1	(AC) <sub>8</sub> GC	56	2,5
M2	(AC) <sub>8</sub> CTG	54	2,5
M7	(CAG) <sub>5</sub>	60	2,5
M11	(CA) <sub>6</sub> (AG)	49	2,5

В реакции использовали ~50 нг геномной ДНК. Условия реакции: первичная денатурация матрицы при 95°C – 5 мин; денатурация 94°C – 45 с; отжиг праймеров 49–60°C (в зависимости от праймера) – 45 с; элонгация 72°C – 1 мин; 40 циклов в амплификаторе. Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 2-процентном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, в 0.5x TBE-буфере. Визуализацию проводили в ультрафиолете с использованием геля-документирующей системы Gel Doc XR+ (BioRad). ISSR-фрагменты оценивали с использованием ДНК-маркера Step100 Long («Биолабмикс»). Составляли бинарные матрицы, где наличие ампликона определенной длины обозначали 1, а его отсутствие – 0.

*Получение семенного потомства регенерантов и их оценка в полевых условиях*

Семенное потомство растений-регенерантов ( $R_0$ ) получали на вегетационной площадке в сосудах с почвенным субстратом. Пробирочные микрорастения помещали под пластиковые колпаки для лучшей приживаемости. Через 2 недели колпаки снимали. Растения изолировали при помощи марлевых изоляторов. В течение вегетационного периода осуществляли уход за растениями, включающий полив, рыхление почвы и прополки, а также отбор по основным хозяйственно ценным признакам (длине и толщине междоузлий, числу боковых ветвей, массе 1000 семян, продуктивности одного растения).

Полевые исследования регенерантных образцов (номеров) проводились на опытном поле ФНЦ агробиотехнологий в пос. Тимирязевском Уссурийского района Приморского края РФ в 2022–2023 гг.

Во все годы испытаний гречихи температурный фон был относительно благоприятным и стабильным. Однако количество и распределение осадков существенно варьировали по годам. В отличие от 2022 г., когда условия увлажнения значительно не отличались от среднеголетних, в 2023 г. в фазу массового цветения *F. esculentum* выпало 461,7 мм осадков, при среднемноголетней

125,0 мм, что создало стрессовые условия (сильное переувлажнение почвы) для роста и развития растений и явилось причиной снижения продуктивности.

Почва опытного участка – лугово-бурая отбеленная, тяжелого механического состава, среднекислая, со средним содержанием питательных элементов. Посев гречихи проведен вручную в I–II декадах июля. Площадь делянки – 2,7–4,5 м<sup>2</sup>. Норма высева – 60 шт. всхожих семян на 1 м<sup>2</sup>, способ посева – широкоярусный с междурядьями 45 см. Образцы высевали по вариантам и оценивали по основным хозяйственно ценным признакам с учетом продолжительности вегетационного периода согласно методическим указаниям по изучению коллекционных

образцов кукурузы, сорго и крупяных культур (Shmaraev, 1968). Масса 1000 семян определялась по ГОСТ 12042-80 (GOST 12042-80..., 2011), содержание белка в плодах – по ГОСТ 10846-91 (GOST 10846-91..., 2009), жира – по ГОСТ 29033-91 (GOST 29033-91..., 2004), пленчатость зерна – по ГОСТ 10843-76 (GOST 10843-76..., 2009).

#### *Статистическая обработка результатов*

Статистическую обработку данных выполняли по «Методике полевого опыта» (Dospikhov, 1979), а также с помощью пакета программ Statistica 6 (Khalafyan, 2008), Past v.3.17. Существенность различий между выборками определяли с помощью НСР (наименьшая существенная разница). Использовался критерий Фишера, кластерный анализ выполнен методом иерархической кластеризации методом Уорда. В исследовании принят уровень значимости  $p \leq 0,05$ . Расчет генетических дистанций Нея ( $D_N$ ), математическую обработку и построение дендрограмм методом попарного внутригруппового невзвешенного среднего (unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) проводили с помощью программ POPGENE Version 1.32 и GelAnalyzer 19.1.

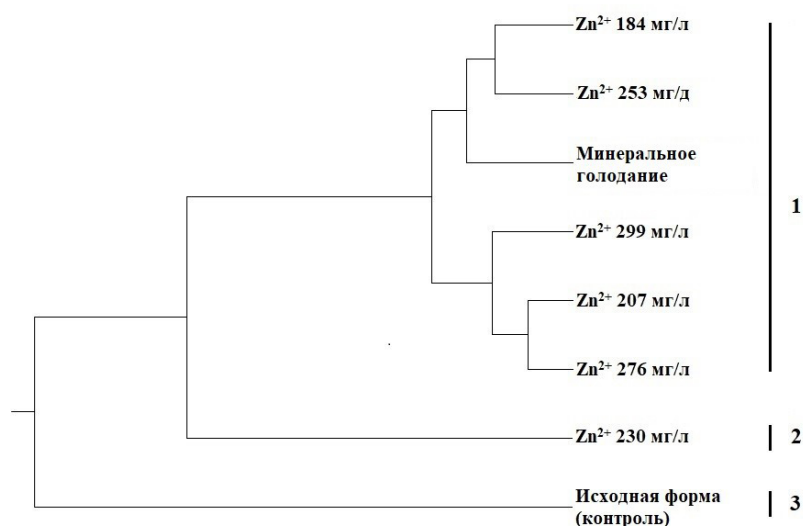
#### **Результаты**

Молекулярно-генетические исследования регенерантных образцов ISSR-методом показали, что четыре ISSR-маркера продуцировали 95 ампликонов, из которых 72 были полиморфными. Полиморфизм в объединенной выборке составил 75,8%. При анализе генетических дистанций Нея ( $D_N$ ) выявлено, что регенеранты, полученные на селективных средах, отличаются от исходной формы, демонстрируя индексы  $D_N$  0,2610–0,5573 (табл. 2), и образуют отдельные кластеры на дендрограмме (рисунок).

По мнению ряда исследователей, ISSR-маркеры в высокой степени полиморфны у гречихи и пригодны для идентификации генотипов (Kadyrova et al., 2010; Sabreena et al., 2021).

**Таблица 2.** Генетические дистанции исходных форм и регенерантов, полученных с использованием ионов цинка и минерального голодания**Table 2.** Genetic distances in the original and regenerated plant forms obtained with the use of zinc ions and mineral starvation

Вариант	Исходная форма	Минеральное голодание	184 мг/л Zn <sup>2+</sup>	207 мг/л Zn <sup>2+</sup>	230 мг/л Zn <sup>2+</sup>	253 мг/л Zn <sup>2+</sup>	276 мг/л Zn <sup>2+</sup>	299 мг/л Zn <sup>2+</sup>
Исходная форма	****							
Минеральное голодание	0,2610	****						
184 мг/л Zn <sup>2+</sup>	0,3723	0,0596	****					
207 мг/л Zn <sup>2+</sup>	0,3793	0,0835	0,0528	****				
230 мг/л Zn <sup>2+</sup>	0,5573	0,2794	0,2742	0,2611	****			
253 мг/л Zn <sup>2+</sup>	0,4093	0,0991	0,0583	0,0639	0,2841	****		
276 мг/л Zn <sup>2+</sup>	0,4020	0,1136	0,1027	0,0337	0,2893	0,0866	****	
299 мг/л Zn <sup>2+</sup>	0,4082	0,1496	0,1595	0,0841	0,3286	0,1327	0,0366	****

**Рисунок.** UPGMA-дендрограмма, основанная на значениях генетических дистанций Нея для регенерантов гречихи, полученных в результате воздействия ионов цинка и минерального голодания *in vitro* (1, 2 – группы вариантов, характеризующаяся наибольшими D<sub>N</sub> по сравнению с исходной формой; 3 – исходная форма)**Figure.** UPGMA dendrogram based on the values of Nei's genetic distances for regenerated buckwheat plants obtained as a result of exposure to zinc ions and mineral starvation *in vitro* (1, 2 – groups of variants characterized by the highest D<sub>N</sub> compared to the original form; 3 – original form)

Важнейший этап успешного создания исходного материала для селекции – оценка его хозяйственной ценности в условиях *in vivo*. Регенерантные образцы гречихи, полученные с использованием селективных сред, показали наличие определенных изменений хозяйственно ценных признаков по сравнению со стандартом в первом и втором поколениях (табл. 3, 4).

Величины морфологических признаков образцов первого полевого поколения варьировали в пределах 5–24% (см. табл. 3). По показателю высоты растений они достоверно не отличались от стандарта, за исключением более низкорослого образца R 1072 – 120,6 см. Образец R 1067, полученный на селективных средах с минераль-

ным голоданием без использования тяжелого металла, оказался высокорослым, существенно превысив сорт-стандарт по высоте в среднем на 9,7 см за счет увеличения зоны плодоношения. Укороченными первыми междоузлиями (3,6–4,5 см) обладали растения, полученные после воздействия минерального голодания и в результате комплексного стресса – минеральное голодание и Zn<sup>2+</sup> 207–253 мг/л, значительно варьируя по данному показателю (CV = 20%). Длина второго междоузлия у образцов R 1069, R 1071, R 1072 (варианты 207, 253, 276 мг/л ионов цинка) оказалась в 1,2–1,3 раза меньше контрольного показателя. По толщине второго междоузлия выделились образцы, полученные на среде с до-



Таблица 3. Хозяйственно ценные признаки регенерантных образцов первого поколения, полученных с использованием селективных сред (2022 г.)  
Table 3. Valuable agronomic characters in the first-generation buckwheat plants regenerated with the use of selective media (2022)

Сорт, № образца	Вариант Zn <sup>2+</sup> в среде, мг / л	Высота растения, см	Длина зон растения, см		Длина междоузлий, см		Толщина междоузлий, см		Число узлов, шт.		Число боковых ветвей, шт.			Продуктивность 1 растения, г	Масса 100 семян, г
			ветвления	плодоношения	1-е междоузлие	2-е междоузлие	1-е междоузлие	2-е междоузлие	на главном стебле	в зоне ветвления	1-го порядка	2-го порядка	3-го порядка		
'Изумруд'	-	130,7	53,3	77,4	5,8	9,2	0,63	0,62	15,0	5,3	4,1	2,6	0,1	4,20	33,7
R 1067	-	140,4	45,2	95,1	3,7	8,0	0,63	0,62	14,2	4,8	4,5	5,0	0,2	4,88	32,9
R 1068	184	132,1	45,8	86,3	4,9	8,3	0,70	0,74	15,6	5,3	4,5	4,2	0	4,68	35,0
R 1069	207	129,5	52,1	77,4	3,6	5,7	0,79	0,81	14,5	5,6	5,6	5,8	0,8	5,39	34,8
R 1070	230	125,1	44,1	81,0	4,5	7,6	0,67	0,70	15,1	4,7	4,5	5,6	0,7	5,42	34,9
R 1071	253	121,9	52,8	69,2	3,7	6,9	0,65	0,66	15,4	5,6	4,7	4,8	0	4,37	37,7
R 1072	276	120,6	40,3	80,4	5,4	6,8	0,70	0,76	14,7	4,8	5,1	5,9	0,1	4,22	34,2
F		4,40*	2,11	4,74*	7,17*	3,48*	2,15	5,22*	1,26	2,28	1,59	3,0	-	3,1*	2,7*
НСР <sub>0,05</sub>		9,1	10,0	10,6	0,9	1,7	0,11	0,09	1,3	0,8	1,1	2,1	-	0,35	3,1
Коэффициент вариации, CV, %		5	11	10	20	15	8	10	3	9	10	24	-	11	6

Примечание: F – критерий Фишера (\* – критерий Фишера значим при  $p \leq 0,05$ ); НСР<sub>0,05</sub> – наименьшая существенная разность; CV – коэффициент вариации

Note: F – Fisher's test (\* – the F-test is significant at  $p \leq 0,05$ ); НСР<sub>0,05</sub> – the least significant difference; CV – coefficient of variation

Таблица 4. Хозяйственно ценные признаки регенерантных образцов второго поколения, полученных с использованием селективных сред (2023 г.)  
Table 4. Valuable agronomic characters in the second-generation buckwheat plants regenerated with the use of selective media (2023)

Сорт, № образца	Вариант Zn <sup>2+</sup> -в среде, мг/л	Высота растения, см	Длина зон растения, см		Длина междоузлий, см		Толщина междоузлий, см		Число узлов, шт.		Число боковых ветвей, шт.			Продуктивность 1 растения, г	Масса 1000 семян, г
			ветвления	плодоношения	1-е междоузлие	2-е междоузлие	1-е междоузлие	2-е междоузлие	на главном стебле	в зоне ветвления	1-го порядка	2-го порядка	3-го порядка		
'Изумруд'	-	37,3	17,0	20,3	5,5	5,1	0,26	0,23	9,4	3,2	1,3	0	0	0,78	32,0
R 1069	207	74,1	41,5	32,6	4,6	6,0	0,45	0,44	12,2	4,6	4,0	0	0	1,41	33,7
R 1070	230	74,8	34,8	40,0	5,8	5,3	0,44	0,44	12,8	4,7	4,2	0	0	1,70	34,5
R 1071	253	84,2	42,6	41,6	4,8	7,6	0,50	0,55	12,8	4,9	4,2	0	0	1,66	35,3
F		111,7*	47,9*	37,7*	2,0	5,6*	66,4*	56,1*	14,0*	23,0*	21,5*	-	-	117,0*	9,2*
НСР <sub>0,05</sub>		5,5	4,8	4,4	1,1	1,4	0,04	0,05	1,2	0,5	0,9	-	-	0,14	1,87
Коэффициент вариации, CV, %		31	35	29	11	19	25	32	14	18	41	-	-	31	5

Примечание: F – критерий Фишера (\* – критерий Фишера значим при p ≤ 0,05); НСР<sub>0,05</sub> – наименьшая существенная разность; CV – коэффициент вариации  
Note: F – Fisher's test (\* – the F-test is significant at p ≤ 0,05); НСР<sub>0,05</sub> – the least significant difference; CV – coefficient of variation

зами 184, 207 и 276 мг/л  $Zn^{2+}$  (0,74–0,81 см). Все регенеранты, за исключением номера R 1068, характеризовались незначительным повышением числа боковых ветвей второго порядка – 4,8–5,9 шт. При этом данный признак оказался наиболее вариативным ( $CV = 24\%$ ). Число ветвей третьего порядка у образцов R 1069 и R 1070 было несколько выше, чем у сорта-стандарта. Они превзошли стандарт по продуктивности одного растения (5,39–5,42 г) в 1,3 раза. Значения показателей продуктивности остальных вариантов слабо различались от стандарта и между собой. Исследуемые образцы отнесены к крупнозерной группе, незначительно варьируя по показателю массы 1000 семян ( $CV = 6\%$ ) – в пределах 32,9–35,0 г, за исключением более крупноплодного образца R 1071 (37,7 г).

Анализ биохимических показателей плодов регенерантных образцов выявил некоторые отличия от исходного сорта по содержанию белка – максимальное его содержание, достоверно превышающее показатели стандарта, отмечено у R 1068 – 13,90% и R 1069 – 13,26%. Содержание жира варьировало в пределах 2,73–3,48%, превышений над стандартом не выявлено.

Регенерантные образцы R 1068, R 1069, R 1070, R 1071 и R 1072 достоверно превысили стандарт по основному показателю качества зерна гречихи – выходу крупы, варьируя от 80,0 до 82,8%, в то время как у сорта-стандарта данный показатель составил 75,0% в среднем.

Таким образом, в 2022 г. для дальнейших исследований были отобраны три образца: R 1069 – по следующим показателям: продуктивность одного растения, длина первого и второго междоузлий, диаметр первого и второго междоузлий, число боковых ветвей первого – третьего порядков, содержание белка, выход крупы; R 1070 – продуктивность одного растения, длина первого междоузлия, число боковых ветвей второго – третьего порядков, выход крупы, а также R 1071 – длина первого и второго междоузлий, число боковых ветвей второго порядка, масса 1000 семян, выход крупы.

В 2023 г., в экстремальных метеорологических условиях с высоким количеством осадков в июле и августе, наблюдалось сильное угнетение роста и развития растений гречихи, снижение продуктивности и показателей качества плодов исследуемых образцов (см. табл. 4). Однако, по сравнению со стандартом, регенерантные образцы показали лучшие значения морфологических признаков. Высота растений в среднем варьировала в пределах 74,1–84,2 см, что существенно выше стандарта (в 2,0–2,3 раза), длины зон ветвления и плодоношения – 34,8–42,6 см (в 2,0–2,5 раза выше) и 32,6–41,6 см (в 1,6–2,0 раза выше) соответственно. Толщина первого и второго междоузлий (0,44–0,55 см) была практически в 2 раза больше стандарта. По числу узлов на главном стебле (12,2–12,8 шт.) и в зоне ветвления (4,6–4,9 шт.) превышение составило 1,3–1,5 раза, по числу ветвей первого порядка (4,0–4,2 шт.) – 3,1–3,2 раза. Продуктивность одного растения регенерантных образцов составила 1,41–1,70 г в среднем, что в 1,8–2,2 раза существенно выше стандарта. По мнению М. А. Зинченко с соавторами (Zinchenko et al., 2013), повышенная толерантность растений к одному стрессору может привести к увеличению устойчивости к другим неблагоприятным факторам.

В 2023 г. также отмечено снижение содержания белка и жира в плодах до 12,2–12,98% и 2,44–2,96%, что на 1,9–3,6% и 5,4–12,7% ниже показателей 2022 г. соответственно. Это связано, в первую очередь, со снижением выхода ядрицы вследствие увеличения пленчатости

плодов до 21,5–22,0% и уменьшения выхода крупы до 78,0–78,5%. При этом показатель выхода крупы у регенерантов был существенно выше, чем у сорта-стандарта (71%). Максимальным содержанием белка, достоверно превышающим стандарт (11,98%), характеризовался образец R 1069 – 12,98%.

Таким образом, в стрессовых условиях 2023 г. выделены перспективные регенерантные образцы R 1069, R 1070, R 1071 – источники хозяйственно ценных признаков. По сравнению с сортом-стандартом, помимо лучших морфологических показателей, они показали достоверное увеличение продуктивности одного растения в 1,8–2,2 раза.

## Заключение

Применение мутагенных факторов *in vitro* – ионов тяжелых металлов ( $Zn^{2+}$ ) и минерального голодания – индуцирует появление генетических отличий от исходной формы у регенерантных образцов *F. esculentum*. Маркерная система, включающая ISSR-маркеры M1, M2, M7 и M11, эффективна для идентификации генотипов и выявляет высокий уровень полиморфизма (75,8%) у регенерантов *F. esculentum*.

При оценке хозяйственно ценных признаков регенерантные образцы гречихи в полевых условиях показали отличия от сорта-стандарта по ряду характеристик, в том числе повышенную толщину междоузлий и продуктивность одного растения. Выход крупы у исследуемых образцов был существенно выше показателей стандарта. По содержанию белка выделен номер R 1069.

Полученные регенерантные образцы гречихи R 1069, R 1070, R 1071 являются перспективным исходным материалом для использования в селекции. Они включены в селекционный процесс ФНЦ агробиотехнологий и проходят дальнейшие испытания.

## References / Литература

- Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*. 1997;25(22):4692–4693. DOI: 10.1093/nar/25.22.4692
- Barsukova E.N., Klykov A.G., Chikina E.L. Usage of the tissue culture method for the development of new forms of *Fagopyrum esculentum* Moench. *Russian Agricultural Science*. 2019;(5):3–6. [in Russian] (Барсукова Е.Н., Клыков А.Г., Чайкина Е.Л. Использование метода культуры ткани для создания новых форм *Fagopyrum esculentum* Moench. *Российская сельскохозяйственная наука*. 2019;(5):3–6). DOI: 10.31857/S2500-2627201953-6
- Borovaya S.A., Klykov A.G., Barsukova E.N. Influence of the toxic effect of zinc and mineral starvation on the growth and development of buckwheat plantlets *in vitro*. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2023;184(2):9–18. [in Russian] (Боровая С.А., Клыков А.Г., Барсукова Е.Н. Влияние токсического действия цинка и минерального голодания на рост и развитие гречихи посевной в культуре *in vitro*. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2023;184(2):9–18). DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-9-18
- Butovets E.S., Lukyanchuk L.M., Koldirova G.A., Kubankova G.V., Efremova O.S. Studying regenerated soybean lines for their useful agronomic and biochemical characteristics. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2024;185(2):38–49. [in Russian] (Бутовец Е.С.,



- Лукьянчук Л.М., Кодирова Г.А., Кубанкова Г.В., Ефремова О.С. Изучение регенерантных линий сои по хозяйственно ценным и биохимическим характеристикам. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2024;185(2):38-49. DOI: 10.30901/2227-8834-2024-2-38-49
- Dospekhov B.A. Methodology of field trial (with fundamentals of statistical processing of research results) (*Metodika polevogo opyta [s osnovami statisticheskoy obrabotki rezultatov issledovaniy]*). 4th ed. Moscow: Kolos; 1979. [in Russian] (Доспехов Б.А. Методика полевого опыта (с основами статистической обработки результатов исследований). 4-е изд. Москва: Колос; 1979).
- Erturk F.A., Agar G., Arslan E., Nardemir G. Analysis of genetic and epigenetic effects of maize seeds in response to heavy metal (Zn) stress. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2015;22(13):10291-10297. DOI: 10.1007/s11356-014-3886-4
- GOST 10843-76. Interstate standard. Grain. Method for determination of filmness. Moscow: Standartinform; 2009. [in Russian] (ГОСТ 10843-76. Межгосударственный стандарт. Зерно. Метод определения пленчатости. Москва: Стандартинформ; 2009). URL: <http://gost.gtsever.ru/Data2/1/4294840/4294840035.pdf> [дата обращения: 15.05.2025].
- GOST 10846-91. Interstate standard. Grain and products of its processing. Method for determination of protein. Moscow: Standartinform; 2009. [in Russian] (ГОСТ 10846-91. Межгосударственный стандарт. Зерно и продукты его переработки. Метод определения белка. Москва: Стандартинформ; 2009). URL: <https://normativ.kontur.ru/document?moduleId=9&documentId=468933> [дата обращения: 15.05.2025].
- GOST 12042-80. Interstate standard. Seeds of farm crops. Methods of determination of 1000 seed weight. Moscow: Standartinform; 2011. [in Russian] (ГОСТ 12042-80. Межгосударственный стандарт. Семена сельскохозяйственных культур. Методы определения массы 1000 семян. Москва: Стандартинформ; 2011). URL: <https://fsvps.gov.ru/files/gost-12042-80-mezhgosudarstvennyj-standart-s> [дата обращения: 15.05.2025].
- GOST 29033-91. Interstate standard. Grain and derived products. Determination of fat content. Moscow: Publishers of the Standards; 2004. [in Russian] (ГОСТ 29033-91. Межгосударственный стандарт. Зерно и продукты его переработки. Метод определения жира. Москва: Издательство стандартов; 2004). URL: <https://internet-law.ru/gosts/gost/10417> [дата обращения: 15.05.2025].
- Harbison S.T., Chang S., Kamdar K.P., Mackay T.F.C. Quantitative genomics of starvation stress resistance in *Drosophila*. *Genome Biology*. 2005;6(4):R36. DOI: 10.1186/gb-2005-6-4-r36
- Kadyrova G.D., Kadyrova F.Z., Martirosyan E.V., Ryzhova N.N. Analysis of genomic diversity of samples and cultivars in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) by the ISSR-method. *Agricultural Biology*. 2010;45(5):42-48. [in Russian] (Кадырова Г.Д., Кадырова Ф.З., Мартиросян Е.В., Рыжова Н.Н. Анализ геномного разнообразия образцов и сортов гречихи посевной и татарской ISSR-методом. *Сельскохозяйственная биология*. 2010;45(5):42-48).
- Khalafyan A.A. STATISTICA 6. Statistical data analysis (STATISTICA 6. Statisticheskiy analiz dannykh). Moscow: Binom-Press; 2008. [in Russian] (Халафян А.А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных. Москва: Бином-Пресс; 2008).
- Klykov A.G., Barsukova E.N. Biotechnology and buckwheat breeding in the Russian Far East. Vladivostok: PSP95; 2021. [in Russian] (Клыков А.Г., Барсукова Е.Н. Биотехнология и селекция гречихи на Дальнем Востоке России. Владивосток: ПСП95; 2021).
- Kolyasnikova N.L. Problems of genetic safety (*Problemy geneticheskoy bezopasnosti*). Perm: Prokrost; 2019. [in Russian] (Колясникова Н.Л. Проблемы генетической безопасности. Пермь: Прокрост; 2019).
- Rakhmikhudoev G. Buckwheat crop in the Pamir Mountains (*Kultura grechikhi na Pamire*) [dissertation]. Dushanbe; 2000. [in Russian] (Рахмихудилов Г. Культура гречихи на Памире: дис. ... докт. с.-х. наук. Душанбе; 2000).
- Sabreena, Nazir M., Mahajan R., Hashim M.J., Iqbal J., Alyemeni M.N. et al. Deciphering allelic variability and population structure in buckwheat: An analogy between the efficiency of ISSR and SSR markers. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 2021;28(11):6050-6056. DOI: 10.1016/j.sjbs.2021.07.061
- Shmaraev G.E. (ed.). Guidelines for studying collection accessions of maize, sorghum and groat crops (millet, buckwheat, and rice) (*Metodicheskiye ukazaniya po izucheniyu kollektzionnykh obraztsov kukuruzy, sorgo i krupnyanykh kultur [proso, grechikha, ris]*). Leningrad: VIR; 1968. [in Russian] (Методические указания по изучению коллекционных образцов кукурузы, сорго и крупяных культур (просо, гречиха, рис) / под ред. Г.Е. Шмараева. Ленинград: ВИР; 1968).
- Singh S., Parihar P., Singh R., Singh V.P., Prasad S.M. Heavy metal tolerance in plants: Role of transcriptomics, proteomics, metabolomics, and ionomics. *Frontiers in Plant Science*. 2016;6:1143. DOI: 10.3389/fpls.2015.01143
- Suvorova G. Buckwheat tissue cultures and genetic transformation. In: M. Zhou, I. Kreft, S.H. Woo, N. Chrungoo, G. Wierslander (eds). *Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat*. London: Academic Press; 2016. p.365-375. DOI: 10.1016/B978-0-12-803692-1.00029-8
- Ul'yanenko L.N., Reva E.V., Synzynys B.I. Cytogenetic effects in *Allium cepa* L. resulted from separate and combined exposure to Cu, Zn and Ni. *Agricultural Biology*. 2017;52(1):183-190. [in Russian] (Ульяненко Л.Н., Рева Е.В., Сынзыныс Б.И. Цитогенетические эффекты у *Allium cepa* L. при раздельном и сочетанном действии Cu, Zn и Ni. *Сельскохозяйственная биология*. 2017;52(1):183-190). DOI: 10.15389/agrobiology.2017.1.183rus
- Üstündağ Ü., Çavuşoğlu K., Yalçın E. Comparative analysis of cyto-genotoxicity of zinc using the comet assay and chromosomal abnormality test. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2024;31(44):56140-56152. DOI: 10.1007/s11356-024-34940-0
- Viana V.E., Pegoraro C., Busanello C., Costa de Oliveira A. Mutagenesis in rice: The basis for breeding a new super plant. *Frontiers in Plant Science*. 2019;10:1326. DOI: 10.3389/fpls.2019.01326
- Zhang J., Jiang F., Shen Y., Zhan Q., Bai B., Chen W. et al. Transcriptome analysis reveals candidate genes related to phosphorus starvation tolerance in sorghum. *BMC Plant Biology*. 2019;19(1):306. DOI: 10.1186/s12870-019-1914-8
- Zinchenko M., Dubrovnyaya O., Bovol A. *In vitro* selection of wheat for complex resistance and analysis of obtained form. *Izvestia of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2013;15(3-5):1610-1614. [in Russian] (Зинченко М.А., Дубровная О.В., Бавол А.В. Клеточная селекция мягкой пшеницы на устойчивость

к комплексу стрессовых факторов и анализ полученных форм. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2013;15(3-5):1610-1614).

Zlobin I.E. Early stressor responses of rapeseed plants to an increase in the levels of copper and zinc (Ranniye stressornye otvety rasteniy rapsa na povyshennye urovni medi

i tsinka v srede) [dissertation]. Moscow: Timiryazev Institute of Plant Physiology; 2015. [in Russian] (Злобин И.Е. Ранние стрессорные ответы растений рапса на повышенные уровни меди и цинка в среде: дис. ... канд. биол. наук. Москва: Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева; 2015).

#### *Информация об авторах*

**Светлана Александровна Боровая**, научный сотрудник, Федеральный научный центр агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки, 692539 Россия, Уссурийск, пос. Тимирязевский, ул. Воложенина, 30, borovayasveta@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7440-5129>

**Алексей Григорьевич Клыков**, доктор биологических наук, академик РАН, заведующий отделом, Федеральный научный центр агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки, 692539 Россия, Уссурийск, пос. Тимирязевский, ул. Воложенина, 30, alex.klykov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2390-3486>

#### *Information about the authors*

**Svetlana A. Borovaya**, Researcher, Federal Scientific Center of Agricultural Biotechnology of the Far East named after A.K. Chaika, 30 Volozhenina St., Timiryazevsky Settle., Ussuriysk 692539, Russia, borovayasveta@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7440-5129>

**Alexey G. Klykov**, Dr. Sci. (Biology), Full Member (Academician) of the RAS, Head of a Department, Federal Scientific Center of Agricultural Biotechnology of the Far East named after A.K. Chaika, 30 Volozhenina St., Timiryazevsky Settle., Ussuriysk 692539, Russia, alex.klykov@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-2390-3486>

**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 21.05.2025; одобрена после рецензирования 14.09.2025; принята к публикации 14.10.2025. The article was submitted on 21.05.2025; approved after reviewing on 14.09.2025; accepted for publication on 14.10.2025.