

ИЗУЧЕНИЕ И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕСУРСОВ РАСТЕНИЙ

Научная статья
УДК 633.12:606:63:631.95
DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-9-18



Влияние токсического действия цинка и минерального голодания на рост и развитие гречихи посевной в культуре *in vitro*

С. А. Боровая, А. Г. Клыков, Е. Н. Барсукова

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

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

Актуальность. Гречиха посевная – крупяная культура, обладающая высоким потенциалом генетического улучшения селекционного материала, адаптированного к абиотическим стрессам. На сегодняшний день отсутствуют сообщения о получении *in vitro* устойчивых к высоким дозам цинка и недостатку макроэлементов регенерантов гречихи, в том числе с комплексной устойчивостью к данным стрессорам.

Материалы и методы. На питательных средах *in vitro* с добавлением селективного фактора $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ в концентрации 808–1313 мг/л культивировали асептические одноузловые черенки полученных регенерантов гречихи посевной сортов 'Дикуль' и 'Изумруд'. Для моделирования минерального голода выжившие растения микрорепродуцировали на питательные среды без макросолей. Оценка морфобиологических признаков и адаптационной реакции микрорастений проводили по следующим показателям: высота растения, число междоузлий, число листьев, длина листовой пластинки, наличие корней и окраска листьев.

Результаты. Индуцирование прямой регенерации исследуемых сортов гречихи на селективных средах с цинком и минеральным голоданием *in vitro* показало высокую толерантность отобранных растений к стрессам. По результатам проведенных исследований были выделены устойчивые линии сортов 'Изумруд' и 'Дикуль'. При этом наибольшая стрессоустойчивость выявлена у сорта 'Дикуль'. Полученные в селективных условиях пробирочные регенеранты гречихи являются перспективным материалом для дальнейшей селекции, а также для исследования возможности их использования в качестве фиторемедиаторов.

Ключевые слова: *Fagopyrum esculentum* Moench, селективные среды, цинк, морфобиологические показатели, стрессоустойчивость

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., 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

STUDYING AND UTILIZATION OF PLANT GENETIC RESOURCES

Original article

DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-9-18

Influence of the toxic effect of zinc and mineral starvation on the growth and development of buckwheat plantlets *in vitro*

Svetlana A. Borovaya, Aleksey G. Klykov, Elena N. Barsukova

*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. Common buckwheat is a cereal crop with high potential for genetic improvement in terms of developing breeding material resistant to abiotic stressors. To date, there have been no reports on *in vitro* production of buckwheat plantlets resistant to high doses of zinc and a lack of macronutrients.

Materials and methods. Aseptic single-node cuttings from the obtained regenerated plants of common buckwheat cultivars 'Dikul' and 'Izumrud' were cultivated *in vitro* on nutrient media with the addition of the selection factor $ZnSO_4 \times 7 H_2O$ in a concentration of 808–1313 mg/L. Survived plants were microcloned on nutrient media without macrosalts for mineral starvation modeling. Morphological traits and general nonspecific adaptation reactions of the plantlets were evaluated for the following characteristics: plant height, the number of internodes, the number of leaves, leaf blade length, the presence of roots, and leaf color.

Results. According to the results of the 33-day cultivation of test-tube microcuttings on media with zinc toxicity, 33–91% of lines resistant to ionic stress were selected in different variants. The secondary testing of the plantlets under conditions of mineral starvation *in vitro* turned out to be the strongest inhibitory factor for buckwheat. At the same time, high resistance to stress was observed in cv. 'Dikul'. Cultivation of the obtained buckwheat lines on the MS nutrient medium for two passages showed a sufficiently high level of regeneration in the studied genotypes. The test-tube buckwheat plantlets obtained under selective conditions are promising material for further breeding as well as for studying the possibility of their use as phytoremediators.

Keywords: *Fagopyrum esculentum* Moench, selective media, morphological characteristics, stress resistance

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., 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. DOI: 10.30901/2227-8834-2023-2-9-18

Введение

Проблема создания сортов и гибридов сельскохозяйственных культур с различными параметрами, удовлетворяющими требованиям производства, является важнейшей задачей селекции. Перспективным способом получения нового исходного материала и повышения генетического разнообразия культурных растений на современном этапе является селекция с использованием селективных факторов в клеточно-тканевой культуре *in vitro*. Эффективность такого подхода базируется на снижении уровня репарационной защиты изолированных тканей и органов, выведенных из-под протекции донорного организма. Экспланты подвергаются воздействию широкого спектра селективных агентов, добавленных в питательную среду, а выжившие формы отбираются для дальнейшей селекционной работы. Применение селективных фонов с тяжелыми металлами (ТМ) может значительно расширить генетический базис растительных организмов и привести к появлению ценных генотипов с новыми признаками и с высоким потенциалом устойчивости к стрессам (Barsukova et al., 2020).

Цинк относится к числу эссенциальных микроэлементов для растений, необходимых в регуляторных процессах, поддерживающих гомеостаз организма (Skugoreva et al., 2016). В то же время он является потенциально токсичным тяжелым металлом, поскольку его избыточное количество оказывает негативное воздействие на клеточный метаболизм и приводит к дестабилизации биосинтетических процессов (Titov et al., 2007; Skugoreva et al., 2016).

В литературе имеются данные о применении цинка для создания *in vitro* устойчивого к данному виду стресса исходного селекционного материала различных культур. На селективных средах с разными концентрациями Zn получены толерантные растения-регенеранты полевницы побегоносной *Agrostis stolonifera* L. (Gladkov, 2010), капусты полевой *Brassica campestris* L. и горчицы сарептской *Brassica juncea* (L.) Czern. (Rout et al., 1999). Индуцирована регенерация в культуре устойчивых к цинку каллусов щетинника зеленого *Setaria italica* (L.) P. Beauv. (Santantary et al., 1999), табака обыкновенного *Nicotiana tabacum* L. (Lyubenova et al., 2009). Роль цинка, кадмия и меди в накоплении биомассы регенерированных побегов листовых эксплантатов *Vacopa monnieri* (L.) Wettst. исследована Р. М. Naik et al. (2015).

Гречиха посевная (*Fagopyrum esculentum* Moench) является традиционной крупяной культурой в России (Fesenko et al., 2019). Она обладает высоким потенциалом генетического улучшения, в том числе при создании селекционного материала, устойчивого к абиотическим стрессорам. Применение селективных сред с повышенными дозами цинка (до 808 мг/л $ZnSO_4 \times 7 H_2O$) в работе с *F. esculentum* показана в более ранних наших публикациях (Barsukova et al., 2020). В результате получены устойчивые к ионному стрессу растения-регенеранты гречихи с положительными изменениями хозяйственно ценных признаков – повышенным содержанием рутина, высокой семенной продуктивностью и крупнозерностью; также создан перспективный сорт гречихи 'Уссу-рочка' (Klykov et al., 2019).

Нехватку минерального питания можно отнести к основным природным стрессовым факторам. Она связана в первую очередь с дефицитом азота, фосфора, серы, входящих в состав нуклеиновых кислот и фотосинтетических пигментов. Выяснено, что в условиях недостатка

макроэлементов у многих видов растений формируются адаптивные ответы на физиологическом, биохимическом и молекулярном уровнях (Shefflin et al., 2019; Zhang et al., 2019). Одним из способов повышения устойчивости растений к дефициту питательных веществ может считаться улучшение генотипов растений (Gharam et al., 1993), в том числе через отбор устойчивых линий *in vitro*. Такой подход довольно эффективен для выведения сортов, пригодных для возделывания как на обедненных питательными элементами почвах, так и на загрязненных тяжелыми металлами почвенных участках, где отмечено снижение накопления в растениях макроэлементов (Uzakov, 2018).

В настоящее время для гречихи разработаны методики культивирования клеток, тканей и органов, а также условия их регенерации на селективных средах с ТМ, однако такой информации крайне мало (Barsukova et al., 2019, 2020). Отсутствуют сообщения о влиянии высоких доз солей цинка (более 800 мг/л) на рост, развитие и регенерационную способность *F. esculentum*, а также о получении устойчивых к недостатку минеральных элементов питания растений гречихи *in vitro*. Особо отметим, что некоторые исследователи рекомендуют в клеточной селекции применять повышение жесткости селективных систем (Shupletsova, 2019). Поэтому изучение токсического воздействия максимальных концентраций Zn и дефицита макроэлементов на рост и развитие гречихи посевной в культуре *in vitro* представляется нам весьма перспективным направлением селекции.

Цель настоящей работы заключалась в исследовании влияния высоких доз цинка и минерального голодания на морфобиологические характеристики и адаптационную реакцию растений-регенерантов *F. esculentum* в культуре *in vitro*, а также в получении перспективного материала гречихи для селекции.

Материалы и методы

Стерилизацию бокса, посуды, инструментов, приготовление и автоклавирование питательных сред проводили по общепринятым протоколам (Dunaeva et al., 2017).

Исходный растительный материал включал генотипы гречихи посевной: детерминантный сорт 'Диккуль' селекции ФНЦ зернобобовых и крупяных культур и индетерминантный сорт 'Изумруд' селекции ФНЦ агробиотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки.

Подготовка первичных эксплантов и получение регенерантов

Для введения в культуру *in vitro* использовали зрелые семена гречихи. Семена погружали на 2 мин в концентрированную серную кислоту, затем 3 раза по 5 мин промывали автоклавированной дистиллированной водой, после чего в стерильных условиях бокса освобождали от перикарпия и высаживали на безгормональную питательную среду с минеральной основой по Т. Мурасиге и Ф. А. Скугу (Murashige, Skoog, 1962), дополненную сахарозой (20 г/л) и агаром (6 г/л) (далее МС1) в пробирки с ватно-марлевыми пробками. Изолированные *in vitro* экспланты культивировали при освещенности 4 тыс. лк, температуре 22–25°C, фотопериоде 16 ч в условиях культуральной комнаты.

Для микроразмножения использовали одноузловые черенки длиной 1–1,5 мм с пазушной почкой, полученные в результате деления стебля полученных сеянцев. Их субкультивировали на питательной среде МС1 в тече-

ние 5 пассажей для получения необходимого числа микрорастений, которые использовали в опытах с селективными средами.

Состав селективных сред и проведение эксперимента

Для создания селективных условий в безгормональную питательную среду МСI вносили соль цинка ($ZnSO_4 \times 7 H_2O$) в следующих количествах по вариантам опыта: 808, 909, 1010, 1111, 1212 и 1313 мг/л. Для моделирования минерального голода использовали питательную среду МСI, из которой были исключены макросоли (МСII). Черенки с пазушной почкой, полученные в результате деления стебля пробирочных микрорастений (2-3 нижних междоузлия), культивировали в течение 33 дней на среде МСI со стандартным содержанием сульфата цинка 8,6 мг/л (контроль) и на селективных средах с разными концентрациями солей цинка (варианты опыта). Число пробирок по каждому варианту – 20. Толерантные (выжившие) растения черенковали на питательную среду МСII без макросолей и культивировали 40 дней, после чего проводили два субкультивирования продолжительностью 33 суток каждое на питательной среде МСI с целью изучения адаптационной реакции ре-

генерантов. В конце опытов оценивали их морфобиологические признаки: высота растения, число междоузлий, число листьев, длина листовой пластинки, наличие корней и окраска листьев.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Microsoft Excel и PAST v. 4.03.

Обсуждение результатов

При введении в культуру *in vitro* гречихи сортов 'Изумруд' и 'Диккуль' были получены микрорастения, которые хорошо развивались, формируя нормальные стебли, листовые пластинки и корешки. Скорость регенерации растений зависела от сорта гречихи (рис. 1).

У сорта 'Изумруд' через одни сутки после высаживания семян на питательную среду отмечено появление корешков. В то же время у сорта 'Диккуль' корешки начали образовываться на 4-е сутки, а скорость роста микроростков была значительно ниже. При этом у некоторых растений данного сорта бутоны закладывались уже на 6-7-е сутки, а цветение начиналось на 14–27-е сутки (рис. 2), в то время как у сорта 'Изумруд' образование бутонов не

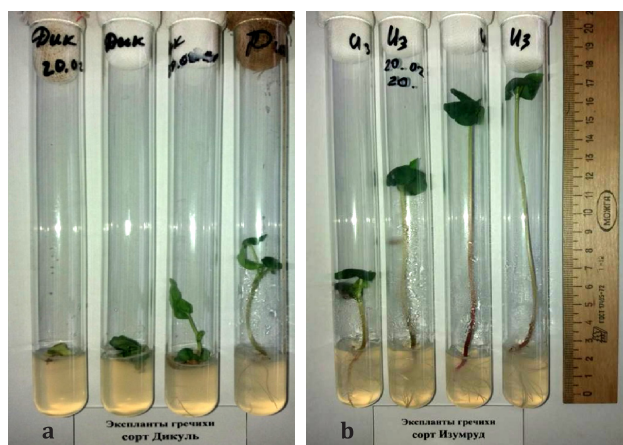


Рис. 1. Микроростки гречихи сортов 'Диккуль' (а) и 'Изумруд' (б), образовавшиеся на 13-е сутки после высаживания семян на питательную среду МСI

Fig. 1. Buckwheat plantlets of cvs. 'Dikul' (a) and 'Izumrud' (b) on the 13th day after the seeds were planted on the MCI medium

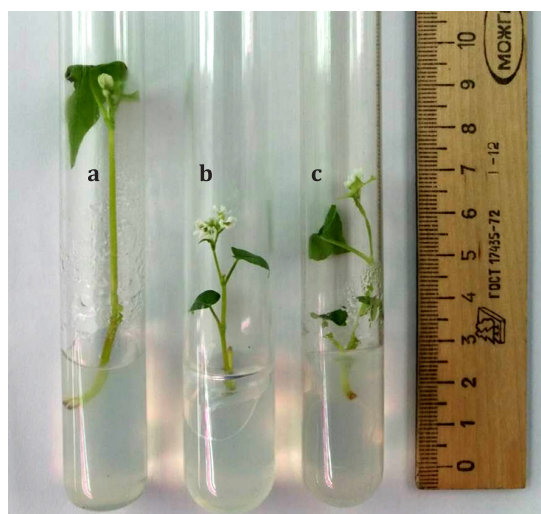


Рис. 2. Регенеранты сорта 'Диккуль' с бутонами на 7-й день (а) и цветками на 27-й день (б, с) культивирования на питательной среде МСI

Fig. 2. Regenerated buckwheat plantlets of cv. 'Dikul' with buds on the 7th day of cultivation (a) and with flowers on the 27th day of cultivation (b, c)

наблюдалось даже к концу пассажа на 30–33-и сутки. Эта тенденция в дальнейшем сохранялась, микрорастения детерминантного сорта 'Дикуль' отставали в росте от индетерминантного сорта 'Изумруд', что, видимо, обусловлено особенностями генотипа исследуемых сортов.

Известно, что наиболее значимыми показателями токсичности цинка являются задержка роста растений, снижение биомассы, хлороз, связанные в первую очередь с нарушениями работы фотосинтетического аппарата (Kaznina, Titov, 2017). Сообщается, что Zn, наряду с другими тяжелыми металлами, вызывает значительное уменьшение уровня содержания каротиноидов и хлорофилла, сопровождающееся снижением фотохимической эффективности фотосистемы II (Li et al., 2012; Maleva et al., 2012). Кроме этого, ТМ снижают поступление элементов минерального питания в растения, угнетая их развитие (Kabata-Pendias, Pendias, 2001). Культивирование микроклонов изучаемых сортов *F. esculentum* на селективных средах с разными дозами цинка в течение 33 суток привело к ингибированию роста и развития гречихи во всех вариантах, особенно по показателям высоты растения и длины листовой пластинки, которые снизились по сравнению с контролем в среднем на 58,8–98,2% и на 42–82% соответственно (рис. 3, 4). Листья приобретали преимущественно желто-зеленую окраску. У исследуемых растений полностью отсутствовало корнеобразование.

Реакция пробирочных растений рассматриваемых сортов на селективный фактор Zn оказалась разной. Более интенсивно ростовые и формообразовательные процессы проходили у детерминантного сорта 'Дикуль', чем у индетерминантного сорта 'Изумруд'. В вариантах с применением токсиканта сорт 'Дикуль' превзошел 'Изумруд' по всем исследуемым показателям: высоте растения – в среднем в 2,3–5,8 раза, длине листовой пластинки – в 1,1–2,8 раза, числу междоузлий – в 1,1–2,2 раза, числу

листьев – в 1,4–1,9 раза. Вероятно, сорт 'Дикуль' генетически более устойчив к повышенным концентрациям цинка.

Более жесткие селективные условия с концентрациями сульфата цинка 1111, 1212 и 1313 мг/л оказали максимальный токсический эффект на наиболее чувствительный к ионному стрессу сорт 'Изумруд' – по окончании культивирования здесь было выбраковано 50–67%, а на средах с внесением 808–1010 мг/л $ZnSO_4$ – 25–30% микрорастений, в то время как у сорта 'Дикуль' погибло 18–45% и 9–18% микрорастений соответственно.

Последующее культивирование растений, полученных на контрольных вариантах и селективных средах с солью цинка, в условиях минерального голодания *in vitro* на среде МСII без макросолей в течение 40 дней оказалось для них сильнейшим стрессом. Большинство их погибло (табл. 1), а оставшиеся выглядели сильно угнетенными – в виде слаборазвитых листовых розеток либо небольших микрорастений длиной 1,5–2 см с 1-2 мелкими (2-3 мм) листовыми пластинками и без корешков.

Сорт 'Дикуль' продемонстрировал повышенную адаптационную реакцию к комплексному стрессору, что выразилось в большем количестве выживших растений (34,2%) и в формировании у некоторых регенерантов корневой системы в виде отдельных небольших корешков.

Выжившие микрорастения клонировали на питательную среду МСI. Было проведено два пассажа, каждый длительностью 33 суток, в конце каждого пассажа проводили описание морфобиологических показателей полученных линий гречихи. Анализ данных после первого пассажа показал, что последствие стрессовых факторов сохранилось (табл. 2). У сорта 'Изумруд' отсутствовал ризогенез. Более стрессоустойчивый сорт 'Дикуль' после вариантов со стандартным содержанием цинка и с кон-

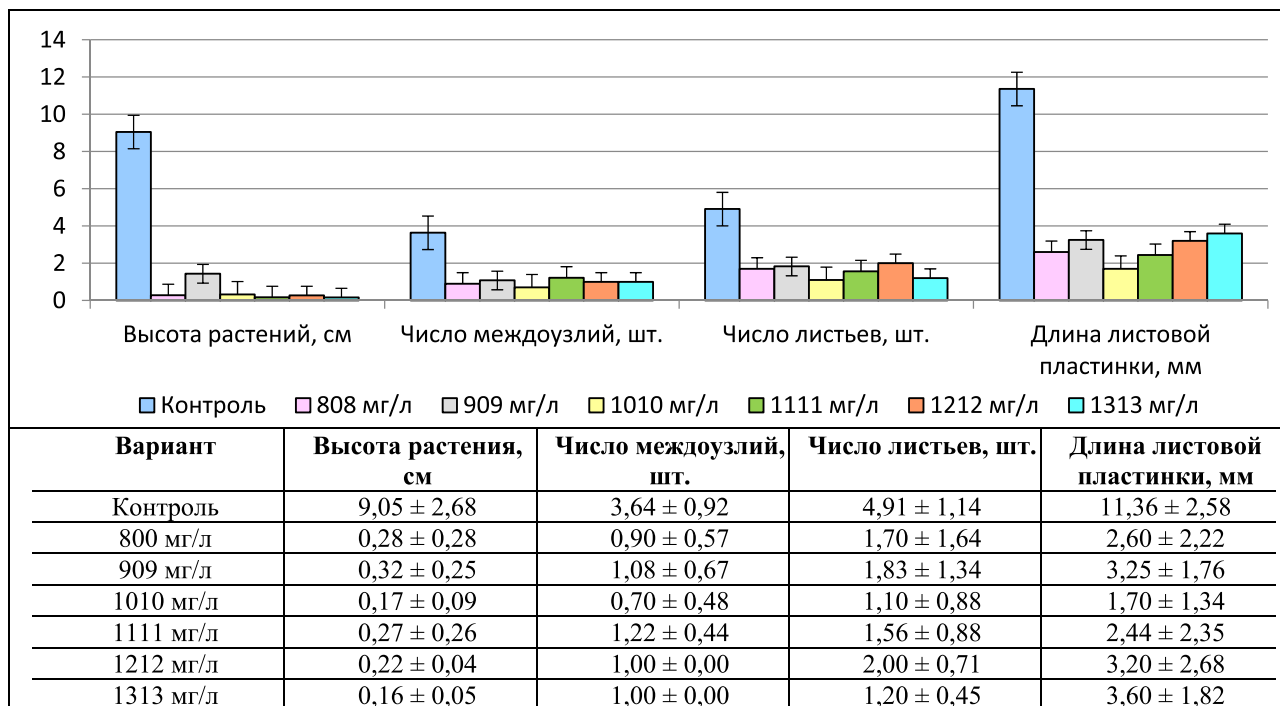


Рис. 3. Морфобиологические показатели гречихи сорта 'Изумруд' в культуре *in vitro* на селективных средах с Zn^{2+} после 33 суток культивирования

Fig. 3. Morphobiological characteristics of the *in vitro* culture of buckwheat (cv. 'Izumrud') on selective media with Zn^{2+} on the 33rd day of cultivation

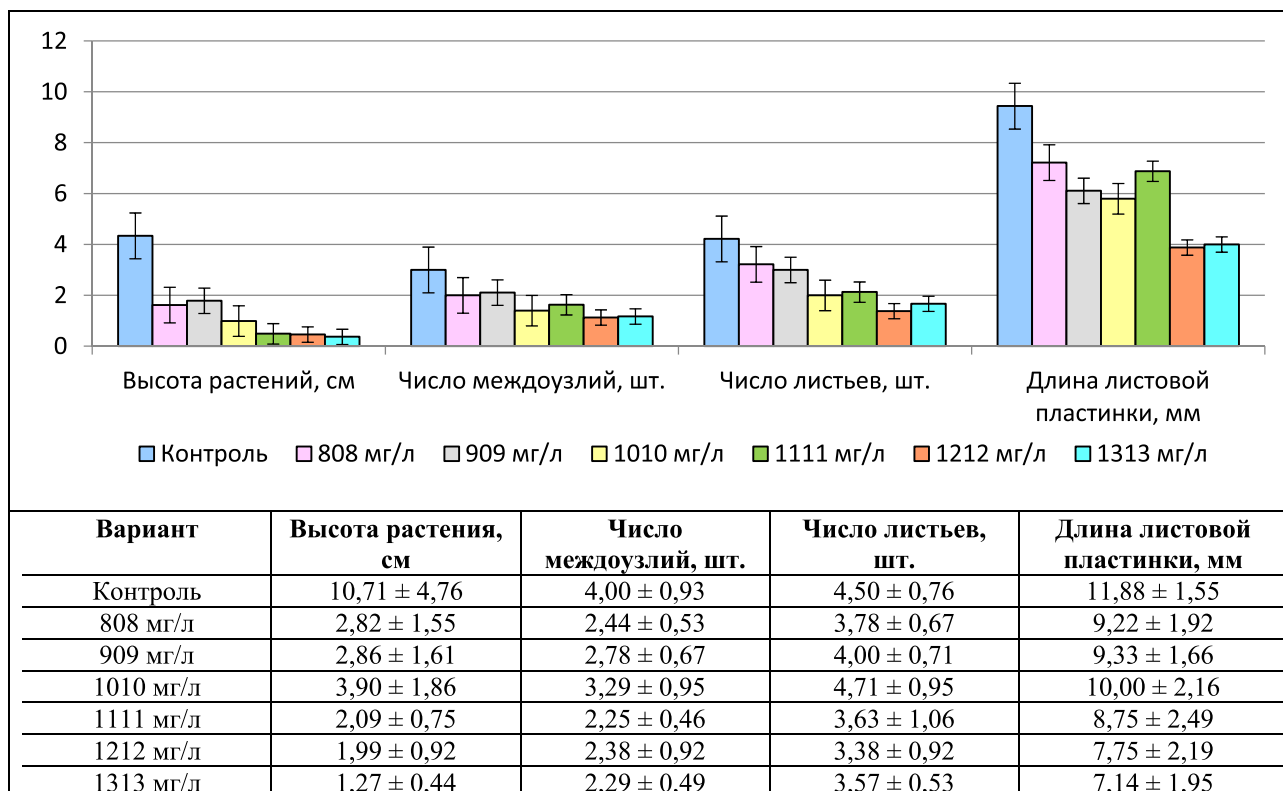


Рис. 4. Морфобиологические показатели гречихи сорта 'Дикуль' в культуре *in vitro* на селективных средах с Zn²⁺ после 33 суток культивирования

Fig. 4. Morphobiological characteristics of the *in vitro* culture of buckwheat (cv. 'Dikul') on selective media with Zn²⁺ on the 33rd day of cultivation

Таблица 1. Влияние минерального голодания на выживаемость растений гречихи, полученных после культивирования на селективных средах с ZnSO₄

Table 1. Influence of mineral starvation on the survivability of buckwheat plants obtained after cultivation on selective media with ZnSO₄

Сорт	Количество микрорастений по вариантам опыта, шт.							Общее количество выживших микрорастений, шт.
	Контроль (8,6 мг/л)	808 мг/л	909 мг/л	1010 мг/л	1111 мг/л	1212 мг/л	1313 мг/л	
Изумруд	50 / 11	14 / 4	18 / 4	14 / 10	12 / 2	8 / 2	8 / 2	35
Дикуль	50 / 34*	20 / 10*	18 / 0	14 / 6	16 / 6	16 / 6	12 / 4	50

Примечание: слева от косой черты – количество микроклонов гречихи, отобранных после 33 суток культивирования на среде МСI с селективным агентом Zn²⁺ и высаженных на МСII; справа – после субкультивирования на среде МСII в течение 40 суток; * – наличие корешков у микрорастений

Note: to the left of the slash is the number of buckwheat plantlets selected on the 33rd day of cultivation on the MCI with Zn²⁺ as the selecting agent and grown on the MCII; to the right of the slash is their number after subculturing on the MCII for 40 days; * – the presence of roots in plantlets

Таблица 2. Морфобиологические показатели микропобегов гречихи (1 пассаж на MCI после селективных сред с Zn²⁺ и минерального голодания)

Table 2. Morphobiological characteristics of buckwheat microshoots (the 1st passage on the MCI medium after selective media with Zn²⁺ and mineral starvation)

Вариант	Морфобиологические показатели					
	Высота растения, см	Число междоузлий, шт.	Число листьев, шт.	Длина листовой пластинки, мм	Наличие корней, +/-	Окраска листьев*
сорт 'Изумруд'						
Контроль	0,65 ± 0,41	1,27 ± 0,47	2,55 ± 0,82	4,27 ± 1,49	-	жел.-зел.
808 мг/л	1,35 ± 0,21	2,00 ± 0,00	4,50 ± 0,71	3,00 ± 0,00	-	жел.-зел.
909 мг/л	0,50 ± 0,00	1,00 ± 0,00	2,50 ± 0,71	2,00 ± 0,00	-	жел.-зел.
1010 мг/л	0,48 ± 0,48	1,25 ± 0,50	2,50 ± 0,58	3,25 ± 0,96	-	жел.-зел.
1111 мг/л	0,50 ± 0,00	1,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	3,00 ± 0,00	-	жел.-кор.
1212 мг/л	0,50 ± 0,00	1,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	-	жел.-кор.
1313 мг/л	0,50 ± 0,00	1,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	-	жел.-кор.
сорт 'Дикуль'						
Контроль	8,86 ± 4,93	3,68 ± 1,17	5,26 ± 2,33	9,76 ± 2,73	+	зел.-жел.
808 мг/л	8,30 ± 5,46	2,75 ± 1,26	4,00 ± 2,16	9,25 ± 3,59	+	зел.-жел.
909 мг/л	-	-	-	-	-	-
1010 мг/л	2,25 ± 2,47	1,50 ± 0,71	5,50 ± 0,71	3,50 ± 0,71	-	зел.-жел.
1111 мг/л	0,40 ± 0,20	1,00 ± 0,00	4,33 ± 2,08	2,67 ± 0,58	-	зел.-жел.
1212 мг/л	0,83 ± 0,58	1,33 ± 0,58	6,00 ± 1,00	1,67 ± 0,58	-	жел.-зел.
1313 мг/л	0,40 ± 0,14	1,00 ± 0,00	2,50 ± 0,71	1,00 ± 0,00	-	жел.-зел.

Примечание: * окраска листьев: жел.-зел. – желто-зеленая, жел.-кор. – желто-коричневая, зел.-жел. – зелено-желтая

Note: * color of leaves: жел.-зел. – yellow-green, жел.-кор. – yellow-brown, зел.-жел. – green-yellow

центрацией 808 мг/л ZnSO₄ характеризовался наличием корешков, а также максимальными значениями по высоте растений (8,30–8,86 см), числу междоузлий (2,75–3,68 шт.) и длине листовой пластинки (9,25–9,76 мм), превосходящими на 84–93%, 27–65% и 56–68% соответствующие показатели сорта 'Изумруд'. Это свидетельствует о более высоком адаптивном потенциале сорта 'Дикуль' в жестких селективных условиях *in vitro*. После воздействия высоких концентраций солей цинка в среде (909–1313 мг/л) наблюдалось заметное снижение ростовых процессов гречихи, что привело к сглаживанию варьирования показателей как по вариантам, так и между сортами. Так, высота растений колебалась в пределах 0,40–0,50 см, число междоузлий – 1,00–1,50 шт., число листьев – 2,00–5,50 шт., длина листовых пластинок – 1,00–3,50 мм.

При дальнейшем культивировании микрорастений на питательной среде MCI (II пассаж) выявлен достаточно высокий уровень регенерации исследуемых генотипов (табл. 3), что, вероятно, обусловлено включением адаптационных механизмов в условиях комплексного стресса, повлекших за собой проявление признаков толе-

рантности выделенных образцов гречихи. Регенеранты характеризовались наличием корневой системы, нормально развитыми стеблями и листовыми пластинками, в основном зеленого цвета (см. табл. 3, рис. 5).

Как видно из таблицы, исключение составили образцы, полученные после выращивания на средах с внесением соли цинка в дозе 1212–1313 мг/л для сорта 'Изумруд' и в дозе 1313 мг/л для сорта 'Дикуль', где наблюдалось снижение ростовых процессов и отсутствие ризогенеза. Однако при последующем микроклонировании растения с данных вариантов восстановили свое корнеобразование.

Выявленная способность исследуемых генотипов к росту в экстремальных условиях показывает высокую степень стрессоустойчивости у изученных сортов *F. esculentum*. На толерантность клеточных культур и микропобегов гречихи посевной к повышенным концентрациям сульфатов меди и цинка *in vitro* указывалось нами ранее (Barsukova et al., 2019). Полученные данные можно рассматривать в аспекте широкого экологического диапазона пластичности гречихи, что подчеркивает ряд авторов (Fesenko, 1983; Kreft, 2007; Chrungoo et al., 2016).

Таблица 3. Регенерационная способность растений гречихи после комплексного стресса (II пассаж на питательной среде МСИ)

Table 3. Regeneration ability of buckwheat plants after the complex stressor (the 2nd passage on the MSI medium)

Вариант	Морфобиологические показатели					
	Высота растения, см	Число междоузлий, шт.	Число листьев, шт.	Длина листовой пластинки, мм	Наличие корней, +/-	Окраска листьев
сорт 'Изумруд'						
Контроль	8,12 ± 6,98	3,92 ± 1,83	5,83 ± 2,92	9,58 ± 5,20	+	зеленые
808 мг/л	6,51 ± 7,30	4,43 ± 3,31	6,57 ± 3,78	8,29 ± 5,41	+	зеленые
909 мг/л	1,35 ± 0,21	1,00 ± 0,00	4,00 ± 1,41	3,00 ± 0,00	+	зеленые
1010 мг/л	7,43 ± 4,95	3,67 ± 0,58	4,67 ± 0,58	12,33 ± 3,21	+	зеленые
1111 мг/л	10,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	11,00 ± 0,00	10,00 ± 0,00	+	зеленые
1212 мг/л	0,30 ± 0,00	1,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	2,00 ± 0,00	-	зелено-желтые
1313 мг/л	0,80 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	-	желтые
сорт 'Дикуль'						
Контроль	11,60 ± 6,23	4,62 ± 1,32	6,57 ± 2,45	13,03 ± 3,06	+	зеленые
808 мг/л	17,51 ± 5,22	5,94 ± 1,21	6,44 ± 1,54	13,78 ± 2,51	+	зеленые
1010 мг/л	17,08 ± 1,42	4,75 ± 1,50	5,50 ± 1,73	16,25 ± 0,96	+	зеленые
1111 мг/л	6,63 ± 6,00	4,14 ± 0,90	6,00 ± 1,91	11,58 ± 4,54	+	зеленые
1212 мг/л	5,06 ± 5,68	3,17 ± 1,99	7,25 ± 2,42	8,42 ± 4,42	+	зеленые
1313 мг/л	1,20 ± 0,00	2,00 ± 0,00	6,00 ± 0,00	5,00 ± 0,00	-	зеленые

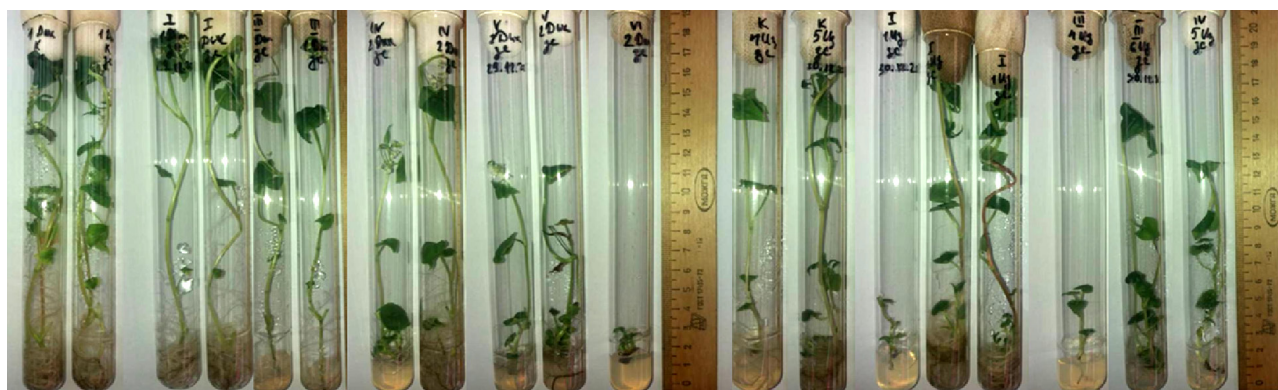


Рис. 5. Микрорастения сортов 'Дикуль' (слева) и 'Изумруд' (справа), толерантные к комплексному стрессу

Fig. 5. Buckwheat plantlets of cvs. 'Dikul' (left) and 'Izumrud' (right) tolerant to the complex stressor

Заключение

По результатам проведенного исследования изучены морфобиологические признаки и адаптационная реакция растений *F. esculentum* сортов 'Изумруд' и 'Дикуль' в культуре *in vitro* в условиях токсического действия высоких доз цинка (808–1313 мг/л) и минерального голодания.

Рост и развитие изучаемых генотипов гречихи на селективных средах показали их высокую толерантность к ионному стрессу, вызванному токсичностью цинка, и к нехватке питательных элементов. При этом выявлен повышенный уровень стрессоустойчивости и регенерационной способности сорта 'Дикуль' по сравнению с сортом 'Изумруд'.

Выделены регенеранты гречихи посевной сортов 'Изумруд' и 'Дикуль', наиболее устойчивые к комплексному стрессу, обусловленному высокими дозами цинка и отсутствием макроэлементов.

Полученные в селективных условиях пробирочные растения-регенеранты гречихи являются перспективным материалом для целей дальнейшей селекции, а также для изучения возможности их использования в качестве фиторемедиаторов.

References / Литература

- 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
- Barsukova E.N., Klykov A.G., Fisenko P.V., Borovaya S.A., Chaykina E.L. Usage of the method of biotechnology in the selection of buckwheat plants in the Far East. *Vestnik of Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences*. 2020;(4):58-66. [in Russian] (Барсукова Е.Н., Клыков А.Г., Фисенко П.В., Боровая С.А., Чайкина Е.Л. Использование методов биотехнологии в селекции гречихи на Дальнем Востоке. *Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук*. 2020;(4):58-66). DOI: 10.37102/08697698.2020.212.4.010
- Chungoo N.K., Dohtdong L., Chetry U. Chapter ten – Phenotypic plasticity in buckwheat. In: M. Zhou, I. Kreft, S.H. Woo, N. Chungoo, G. Wieslander (eds). *Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat*. Cambridge, MA: Academic Press; 2016. p.137-149. DOI: 10.1016/B978-0-12-803692-1.00010-9
- Dunaeva S.E., Pendinen G.I., Antonova O.Yu., Shvachko N.A., Ukhatova Yu.V., Shuvalova L.E., Volkova N.N., Gavrilenko T.A. Preservation of vegetatively propagated crops *in vitro* and cryo collections: methodological guidelines (Sokhraneniye vegetativno razmnzhayemykh kultur v *in vitro* i krio kollektsiyakh: metodicheskiye ukazaniya). Gavrilenko T.A. (ed.). 2nd ed. St. Petersburg: VIR; 2017. [in Russian] (Дунаева С.Е., Пендинен Г.И., Антонова О.Ю., Швачко Н.А., Ухатова Ю.В., Шувалова Л.Е., Волкова Н.Н., Гавриленко Т.А. Сохранение вегетативно размножаемых культур в *in vitro* и крио коллекциях: методические указания / под ред. Т.А. Гавриленко. 2-е изд. Санкт-Петербург: ВИР; 2017).
- Fesenko A.N., Fesenko I.N. Buckwheat breeding and production in Russia during the past 100 years. *Proceedings on Applied Botany, Genetics and Breeding*. 2019;180(1):113-117. [in Russian] (Фесенко А.Н., Фесенко И.Н. Развитие селекции и производства гречихи в России за 100 лет. *Труды по прикладной ботанике, генетике и селекции*. 2019;180(1):113-117). DOI: 10.30901/2227-8834-2019-1-113-117
- Fesenko N.V. Breeding and seed production of buckwheat (Seleksiya i semenovodstvo grechikhi). Moscow: Kolos; 1983. [in Russian] (Фесенко Н.В. Селекция и семеноводство гречихи. Москва: Колос; 1983).
- Gharam M.J., Heavener D.L., Nickell C.D., Widholm J.M. Response of soybean genotypes to boron, zinc and manganese deficiency in tissue culture. *Plant and Soil*. 1993;150(2):307-310.
- Gladkov E.A. Cell selection of *Agrostis stolonifera* plants possessing resistance to heavy metals and salinization. *Russian Journal of Biotechnology*. 2010;(6):72-74. [in Russian] (Гладков Е.А. Клеточная селекция растений полевицы побегоносной (*Agrostis stolonifera*), обладающих устойчивостью к тяжелым металлам и засолению. *Биотехнология*. 2010;(6):72-74).
- Kabata-Pendias A., Pendias H. Trace elements in soils and plants. 3rd ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2001.
- Kaznina N.M., Titov A.F. Effect of zinc deficiency and excess on the growth and photosynthesis of winter wheat. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*. 2017;13(4):88-94.
- Klykov A.G., Barsukova E.N., Chaikina E.L., Anisimov M.M. Prospects and results of selection of *Fagopyrum esculentum* Moench for increased flavonoid content. *Vestnik of Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences*. 2019;3(205):5-16. [in Russian] (Клыков А.Г., Барсукова Е.Н., Чайкина Е.Л., Анисимов М.М. Перспективы и результаты селекции *Fagopyrum esculentum* Moench на повышенное содержание флавоноидов. *Вестник Дальневосточного отделения Российской академии наук*. 2019;3(205):5-16). DOI: 10.25808/08697698.2019.205.3.001
- Kreft I. Buchweizen Slowenien. In: I. Kreft, C. Ries, C. Zewen (eds). *Das Buchweizen Buch: mit Rezepten aus aller Welt. 2. Überarbeitete und erweiterte Aufl.* Arzfeld: Islek ohne Grenzen EWIV; 2007. p.71-79. [in German]
- Li L., Huang X., Borthakur D., Ni H. Photosynthetic activity and antioxidative response of seagrass *Thalassia hemprichii* to trace metal stress. *Acta Oceanologica Sinica*. 2012;(3):98-108. DOI: 10.1007/s13131-012-0210-3
- Lyubanova L., Nehnevajova E., Herzig R., Schröder P. Response of antioxidant enzymes in *Nicotiana tabacum* clones during phytoextraction of heavy metals. *Environmental Science and Pollution Research International*. 2009;16(5):573-581. DOI: 10.1007/s11356-009-0175-8
- Maleva M.G., Nekrasova G.F., Borisova G.G., Chukina N.V., Ushakova O.S. Effect of heavy metals on photosynthetic apparatus and antioxidant status of *Elodea*. *Russian Journal of Plant Physiology*. 2012;59(2):190-197. DOI: 10.1134/S1021443712020069
- Murashige T., Skoog F.A. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 1962;15(3):473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Naik P.M., Godbole M., Nagella P., Hosakatte N.M. The effect of heavy metals on *in vitro* adventitious shoot production and bacoside A content in *Bacopa Monnieri* (L). *Mapana Journal of Sciences*. 2015;14(4):1-10. DOI: 10.12723/mjs.35.1
- Rout G.R., Samantaray S., Das P. *In vitro* selection and biochemical characterisation of zinc and manganese adapted callus

- lines in *Brassica* spp. *Plant Science*. 1999;146(2):89-100. DOI: 10.1016/S0168-9452(99)00080-1
- Samantaray S., Rout G.R., Das P. *In vitro* selection and regeneration of zinc tolerant calli from *Setaria italica* L. *Plant Science*. 1999;143(2):201-209. DOI: 10.1016/S0168-9452(99)00036-9
- Sheflin A.M., Chiniquy D., Yuan C., Goren E., Kumar I., Braud M. et al. Metabolomics of sorghum roots during nitrogen stress reveals compromised metabolic capacity for salicylic acid biosynthesis. *Plant Direct*. 2019;3(3): e00122. DOI: 10.1002/pld3.122
- Shupletsova O.N. *In vitro* selective systems for obtaining barley genotypes with complex resistance to soil stressors (Selektivnye sistemy *in vitro* dlya polucheniya genotipov yachmenya s kompleksnoy ustoychivostyu k pochvennym stressovym faktoram) [dissertation]. Kirov; 2019. [in Russian] [Шуплецова О.Н. Селективные системы *in vitro* для получения генотипов ячменя с комплексной устойчивостью к почвенным стрессовым факторам: дисс. ... д-ра биол. наук. Киров; 2019]. URL: <https://www.dissercat.com/content/selektivnye-sistemy-in-vitro-dlya-polucheniya-genotipov-yachmenya-s-kompleksnoi-ustoychivost> [дата обращения: 11.10.2022].
- Skugoreva S.G., Aschikhmina T.Ya., Fokina A.I., Lyapina E.I. Chemical grounds of toxic effect of heavy metals (review). *Theoretical and Applied Ecology*. 2016;(1):4-10. [in Russian] [Скугорева С.Г., Ашихмина Т.Я., Фокина А.И., Ляпина Е.И. Химические основы токсического действия тяжелых металлов (обзор). *Теоретическая и прикладная экология*. 2016;(1):4-10]. DOI: 10.25750/1995-4301-2016-1-014-019
- Titov A.F., Talanova V.V., Kaznina N.M., Laydinen G.F. Plant resistance to heavy metals (Ustoychivost rasteniy k tyazhelym metallam). N.N. Nemov (ed.). Petrozavodsk; 2007. [in Russian] [Титов А.Ф., Таланова В.В., Казнина Н.М., Лайдинен Г.Ф. Устойчивость растений к тяжелым металлам / под ред. Н.Н. Немова. Петрозаводск; 2007].
- Uzakov Z.Z. Heavy metals and their effect on plants (Tyazhelye metally i ikh vliyaniye na rasteniya). *Simvol nauki = Symbol of Science*. 2018;(1-2):52-54. [in Russian] [Узаков З.З. Тяжелые металлы и их влияние на растения. *Символ науки*. 2018;(1-2):52-54].
- 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

Информация об авторах

Светлана Александровна Боровая, аспирант, научный сотрудник, Федеральный научный центр агроботехнологий 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 агроботехнологий 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>

Елена Николаевна Барсукова, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, и. о. заведующего лабораторией, Федеральный научный центр агроботехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки, 692539 Россия, Уссурийск, пос. Тимирязевский, ул. Воложенина, 30, enbar9@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7880-252X>

Information about the authors

Svetlana A. Borovaya, Postgraduate Student, 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>

Aleksey G. Klykov, Dr. Sci. (Biology), Full Member 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>

Elena N. Barsukova, Cand. Sci. (Agriculture), Leading Researcher, Acting Head of a Laboratory, Federal Scientific Center of Agricultural Biotechnology of the Far East named after A.K. Chaika, 30 Volozhenina St., Timiryazevsky Settle., Ussuriysk 692539, Russia, enbar9@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7880-252X>

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 23.09.2021; одобрена после рецензирования 09.03.2023; принята к публикации 01.06.2023. The article was submitted on 23.09.2021; approved after reviewing on 09.03.2023; accepted for publication on 01.06.2023.