

Е.Н. БАРСУКОВА, А.Г. КЛЫКОВ, П.В. ФИСЕНКО,  
С.А. БОРОВАЯ, Е.Л. ЧАЙКИНА

## Использование методов биотехнологии в селекции гречихи на Дальнем Востоке

*Использование селективных сред с высокими концентрациями ионов цинка и меди приводит к индуцированию наиболее значительных генетических различий у регенерантных линий гречихи. При культивировании микропобегов на селективных средах с повышенным содержанием тяжелых металлов установлено, что с увеличением концентрации в питательной среде ионов меди и цинка повышался их ингибирующий эффект. В условиях ионного стресса под действием высоких концентраций меди (184 мг/л) и цинка (404 мг/л) у растений-регенерантов сорта Изумруд содержание рутина увеличилось на 20–22 % по сравнению с контролем. Представленные в статье данные подтверждают перспективность использования в селекции гречихи методов биотехнологии (селективного фактора – сублетальных концентраций ионов меди и цинка в культуре in vitro) для получения новых генотипов с повышенным уровнем стрессоустойчивости и высоким содержанием флавоноидов.*

*Ключевые слова:* биотехнология, in vitro, *Fagopyrum esculentum* Moench, ISSR-анализ, рутин, ионы тяжелых металлов, селективная среда, Дальний Восток.

**Usage of the method of biotechnology in the selection of buckwheat plants in the Far East.** E.N. BARSUKOVA, A.G. KLYKOV, P.V. FISENKO, S.A. BOROVAYA (Federal Scientific Center of Agrobiotechnology in the Far East named after A.K. Chaika, Primorsky Krai, Ussuriysk), E.L. CHAYKINA (G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS, Vladivostok).

*The results of molecular genetic studies showed that the usage of selective media with high concentration of zinc and cuprum ions induced the most significant genetic differences among buckwheat regenerative lines. It was found in the process of microshoots cultivation on selective media with high concentration of heavy metals that the inhibiting effect of zinc and cuprum ions produced on plants was enhanced with an increase in their concentration in the nutrient medium. The rutin content in plant-regenerants of Izumrud buckwheat variety increased by 20–22 % as compared to reference sample under conditions of ionic stress caused by high concentration of cuprum (184 mg/l) and zinc (404 mg/l). The data presented in the article confirm the potential which the usage of the biotechnology method (the selective factor of the sublethal concentrations of zinc and cuprum ions in vitro culture) in the selection of buckwheat plants for the development of new genotypes with high level of stress resilience and flavonoids content.*

*Key words:* biotechnology, in vitro, *Fagopyrum esculentum* Moench, ISSR-analysis, rutin, heavy metal ions, selective medium, the Far East.

На территории российского Дальнего Востока гречиха посевная, или съедобная (*Fagopyrum esculentum* Moench), выращивается в различных экологических условиях, поэтому для сельскохозяйственного производства необходимы сорта, адаптированные к абиотическим и биотическим факторам среды [9]. Сложность селекции при работе с этим видом состоит в том, что он имеет узкий генетический потенциал устойчивости к действию

---

БАРСУКОВА Елена Николаевна – кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник, исполняющая обязанности заведующего лабораторией, \*КЛЫКОВ Алексей Григорьевич – доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, заведующий отделом, ФИСЕНКО Петр Викторович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, исполняющий обязанности заведующего лабораторией, БОРОВАЯ Светлана Александровна – научный сотрудник (Федеральный научный центр агrobiотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки, Уссурийск), ЧАЙКИНА Елена Леонидовна – научный сотрудник (Тихоокеанский институт биологической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, Владивосток). \*E-mail: alex.klykov@mail.ru

стрессовых факторов. Важнейшей задачей как зарубежной, так и отечественной науки является улучшение существующих сортов *F. esculentum* и создание новых с высоким содержанием рутина, адаптированных к условиям произрастания, болезням и вредителям [8]. Успешное решение задачи такого масштаба возможно на основе междисциплинарных исследований в области генетики, селекции, биохимии, биотехнологии.

Биотехнологические методы позволяют повысить эффективность классических селекционных подходов при создании новых генотипов с повышенным уровнем стрессоустойчивости. Ионы тяжелых металлов (ТМ) считаются одними из наиболее опасных токсикантов, которые вызывают обширные патологические изменения во многих тканях растительного организма. Получение клеточных культур из различных частей растения, манипуляции с ними могут служить базисом для последующего отбора вариантов с качественно новыми показателями [15]. Ранее нами было показано, что при создании новых генотипов гречихи с высоким содержанием флавоноидов представляет интерес использование селективных сред *in vitro* с повышенной концентрацией ионов меди и цинка [1, 9].

Особенностью изучаемой культуры является наличие биофлавоноидов (особенно 3-О-рутинозид кверцетина, или рутина) во всех частях растения [3]. Рутин (витамин Р) применяется в медицине для лечения и профилактики нарушений, связанных с проницаемостью кровеносных капилляров [11]. В ряде стран (России, Украине, Японии) для производства рутина получены специальные сорта *Fagopyrum esculentum* Moench с повышенным его содержанием [8, 12, 16]. Поэтому клеточная селекция с использованием летальных доз ионов тяжелых металлов – это перспективный метод получения растительных форм с улучшенными показателями [14].

Цель настоящего исследования – создание и оценка регенерантных линий гречихи, полученных на селективных средах с повышенным содержанием меди и цинка с применением молекулярно-генетических методов.

## Материалы и методика исследований

Толерантные к ионам тяжелых металлов растения гречихи посевной (*Fagopyrum esculentum* Moench) получены в ФНИЦ агrobiотехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки (пос. Тимирязевский Приморского края) по общепринятым при работе с культурами тканей и клеток методикам [13]. Применялся метод клеточно-тканевой селекции: культивировали микропобеги и каллус на селективных средах с высокими дозами ТМ [2, 9]. Толерантные к ионам тяжелых металлов образцы гречихи и регенерантные линии созданы на основе гибрида Изумруд × Инзерская и сорта Изумруд. Семена проращивали в растворах с содержанием 1150, 2300, 3450 мг/л соли меди и 202, 404, 606 мг/л соли цинка. Регенерантные линии получены в результате культивирования на селективных средах с содержанием сульфата меди (цинка), в мг/л: 23 – Cu<sub>2</sub>, 46 – Cu<sub>4</sub>, 69 – Cu<sub>6</sub>, 161 – Cu<sub>14</sub>, 184 – Cu<sub>16</sub>, 404 – Zn<sub>4</sub>, 606 – Zn<sub>6</sub>. Контролем служили растения исходных образцов, которые выращивали на стандартной среде Мурасиге–Скуга.

Тотальную ДНК выделяли из свежих листьев солевым методом [18] с дополнительным шагом очистки экстракта смесью хлороформ/изоамиловый спирт (24/1). Качество ДНК оценивали методом электрофореза в 1%-м агарозном геле, окрашенном 1%-м раствором бромистого этидия с последующим облучением ультрафиолетом. В качестве стандарта использовалась ДНК фага λ известной концентрации. Концентрацию ДНК определяли на флуориметре MaxLife.

ПЦР выполняли в 2–3-кратной повторности с применением четырех ISSR-праймеров в 10 мкл (табл. 1) на основании литературных данных [6] и с использованием готовой двухреакционной смеси БиоМастер HS-Тaq ПЦР-Color (Биолабмикс).

В реакцию использовали 10–50 нг ДНК матрицы. Амплификацию проводили по программе: начальная денатурация 95 °С – 5 мин; денатурация 94 °С – 45 с; отжиг праймеров 49–60 °С (в зависимости от праймера) – 45 с; элонгация 72 °С – 1 мин; 40 циклов в амплификаторе T100 (Биорад). Концентрацию ионов магния и температуру отжига подбирали индивидуально для каждого праймера. Продукты реакции разделяли методом электрофореза в 2%-м агарозном геле, окрашенном бромистым этидием, в 0,5 × TBE буфере. Визуализацию осуществляли облучением геля ультрафиолетом с использованием геледокументирующей системы GelDocXR + (Биорад).

Таблица 1

Характеристика используемых ISSR-праймеров

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

Для каждого праймера составляли бинарные матрицы, где наличие или отсутствие фрагмента одинаковой молекулярной массы обозначали 1 или 0 соответственно. Расчет генетических характеристик и построение дендрограмм методом UPGMA проводили с использованием пакетов программ POPGENE и TFPGA [19]. Количество рутина в растениях-регенерантах гречихи определяли по М.Н. Запрометову [5] в Тихоокеанском институте биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН. Оптическую плотность исследуемого раствора оценивали на спектрофотометре Shimadzu UV-1700.

## Результаты и обсуждение

В ФНЦ агробιοтехнологий Дальнего Востока им. А.К. Чайки изучение влияния ионов тяжелых металлов на гречихе посевной в культуре *in vitro* проводится с 2006 г. Эксперименты показали, что зрелые семена, клеточные культуры (каллус), микропобеги гречихи характеризуются различной, но достаточно высокой степенью устойчивости к действию повышенных концентраций сульфатов меди и цинка. Изученные генотипы гречихи проявили избирательную степень устойчивости к меди и цинку. Токсическое действие высоких концентраций сульфатов меди и цинка на семена проявилось в большей мере в ингибировании роста корней, чем проростков (рис. 1, 2).

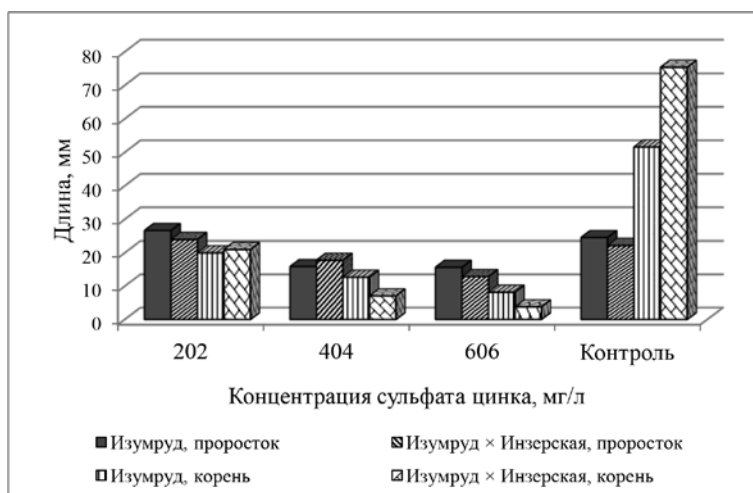


Рис. 1. Влияние сульфата цинка на прорастание семян гречихи посевной



Рис. 2. Влияние сульфата меди на проращивание семян гречихи посевной

Сульфат меди в изученных концентрациях оказался более токсичным, чем сульфат цинка. Под действием повышенных концентраций сульфата цинка в растворе длина корня уменьшилась на 61–84 %, а меди – на 92–96 % по сравнению с контролем. Культивирование микропобегов на селективных средах с повышенным содержанием тяжелых металлов показало, что с увеличением концентрации в питательной среде ионов меди и цинка повышался их ингибирующий эффект на растения гречихи.

Токсическое действие ТМ приводило к уменьшению высоты микрорастений, снижению числа междоузлий и листьев, отсутствию корней. Растения приобретали бледно-зеленую окраску с желтоватым оттенком – характерный признак отрицательного действия ТМ на процесс фотосинтеза.

На средах с медью в концентрации 23 мг/л различия были минимальными. Отрицательное действие меди на растения *in vitro* отмечено начиная с концентрации 46 мг/л. Стрессовое действие значительно возросло при содержании сульфата меди в количестве 161 и 184 мг/л. Данная концентрация была сублетальной, регенерация побегов практически прекратилась.

Отрицательное действие ионов цинка на процессы регенерации из микропобегов гречихи проявилось на селективной среде с содержанием соли 404 и 606 мг/л. Микрорастения, культивируемые на среде с 404 мг/л сульфата цинка, по сравнению с контрольными растениями отличались характерной хлоротичной окраской листьев, замедленным ростом стебля и отсутствием корнеобразования. Перенос выживших микропобегов на среду Мурасиге–Скуга без регуляторов роста и селективных агентов и последующее микроклонирование позволили получить растения гречихи, толерантные к меди и цинку.

В процессе микроразмножения гречихи на средах с ионами меди установлено, что сернистая медь в количестве 9,2–23,0 мг/л стимулирует регенерационные процессы гречихи *in vitro* [17]. При воздействии на клетки каллуса гречихи сернистой меди в количестве 24–60 мг/л наблюдался отрицательный мутагенный эффект: появление в потомстве летальной бесхлорофилльной мутации с частотой 1,5–9,6 %.

Активный синтез фенольных соединений является характерной особенностью вторичного метаболизма гречихи посевной [4, 7]. Важнейшая функция флавоноидов – защита растений от разнообразных вредных экзогенных воздействий. Любой биотический или абиотический стресс (воздействие патогенных грибов, бактерий, вирусов, температурные перепады, механические повреждения, яркий свет, ультрафиолетовое облучение, дисбаланс минеральных компонентов в почве, засуха, засоленность, воздействие озона, гербицидов, солей тяжелых металлов) может привести к интенсификации биосинтеза флавоноидов в различных анатомических частях растения [10].

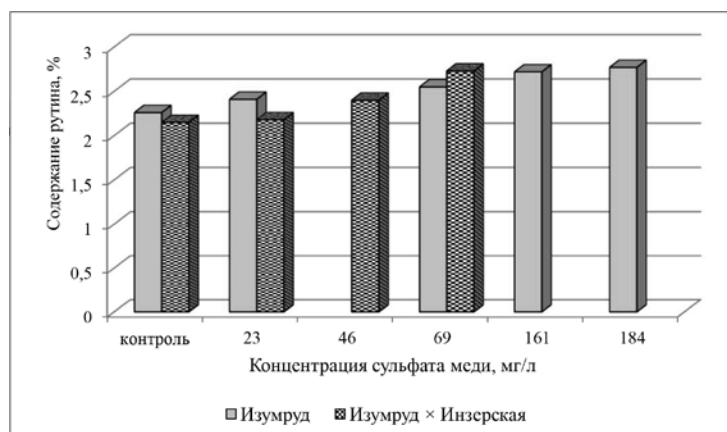


Рис. 3. Содержание рутина в растениях-регенерантах, толерантных к меди, %

В культуре *in vitro* у микрорастений гречихи, полученных под действием высоких концентраций ионов меди и цинка, происходило накопление флавоноида – рутина. Ответной реакцией на стрессовое влияние соли меди в концентрации 161 и 184 мг/л у растений-регенерантов сорта Изумруд синтез рутина увеличивался до 2,72 и 2,77 % соответственно (рис. 3). В растениях гибрида Изумруд × Инзерская, толерантных к соли меди (в среде 69 мг/л), обнаружено максимальное содержание рутина – 2,73 %. Ионный стресс под действием цинка в концентрации 404 мг/л проявился в повышении количества рутина до максимального – 2,83 % у регенерантов Изумруда (рис. 4). В растениях-регенерантах гибрида содержание рутина под действием цинка в данной концентрации привело к уменьшению в сравнении с контролем.

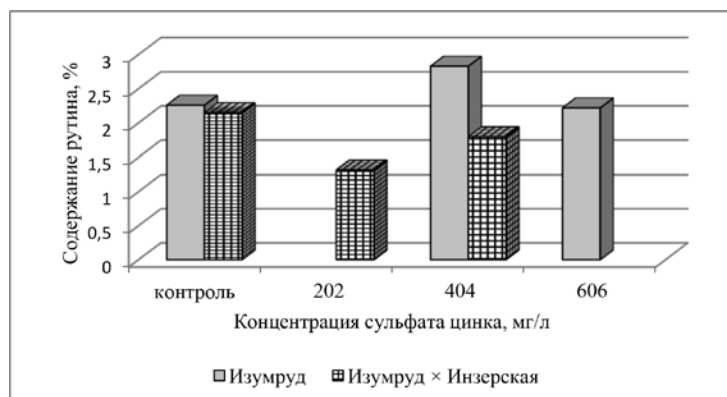


Рис. 4. Содержание рутина в растениях-регенерантах, толерантных к цинку, %

Проявление различной реакции генотипов на стрессовые условия вполне закономерно, так как уровень устойчивости к стрессам является генетически контролируемым и наследуемым признаком. Подтверждением же того, что воздействие высоких концентраций тяжелых металлов индуцирует изменения и мутации у растений в культуре *in vitro*, служат результаты проведенного молекулярно-генетического анализа. Метод маркирования межмикросателлитных последовательностей (ISSR) является относительно простым и современным. Он широко используется для обнаружения внутривидового полиморфизма, а также изменчивости у близкородственных генотипов культурных растений [20, 21, 24, 25].

Методом ISSR-анализа изучено 45 растений сорта гречихи Изумруд и семи его регенерантных линий, толерантных к разным концентрациям ионов меди и цинка. В результате

анализа электрофореграмм, полученных на основе разделения продуктов амплификаций четырех ISSR-праймеров, выявлено 76 ампликонов, 67 из которых оказались полиморфными. Полиморфизм в объединенной выборке составил 88,16 %. Изученные выборки характеризуются различными уровнями изменчивости. Наибольший полиморфизм выявлен у линий, полученных с использованием сульфата меди: в количестве 23 мг/л (Cu2) – 44,74 и 184 мг/л (Cu16) – 40,79 %. Средние значения изменчивости наблюдались у линий, толерантных к содержанию соли меди 161 мг/л (Cu14) – 26,32 %, сульфата цинка 404 мг/л (Zn4) – 23,68 %, сульфата меди 69 мг/л (Cu6) – 18,42 % и соли цинка 606 мг/л (Zn6) – 15,79 %. Наименьший уровень полиморфизма установлен у линии, культивированной в присутствии соли меди 46 мг/л (Cu4) – 7,89 %. У растений исходной формы сорта гречихи Изумруд, культивированных *in vitro*, уровень изменчивости составил 19,74 %, а у растений Изумруд *in vivo* – 30,26 %.

На основании распределения изменчивости амплифицированных фрагментов были рассчитаны коэффициенты генетических различий (генетические дистанции Нея,  $D_N$ ) [23]. Наибольшими генетическими различиями характеризовались пары линий Cu2/Zn6 – 0,5210, Cu2/Cu14 – 0,4969 и Cu2/Zn4 – 0,4677. Наименьшие различия обнаружены между сортом Изумруд *in vivo* и Cu2 – 0,0895 (табл. 2).

Таблица 2

Генетические дистанции исследуемых линий и исходных форм гречихи посевой

Сорт, регенерантная линия	Изумруд <i>in vitro</i>	Изумруд <i>in vivo</i>	Cu2	Cu4	Cu6	Cu14	Cu16	Zn4
Изумруд <i>in vivo</i>	0,1618							
Cu2	0,3373	0,0895						
Cu4	0,1798	0,2378	0,3589					
Cu6	0,1884	0,2413	0,3037	0,1180				
Cu14	0,2243	0,3511	0,4969	0,3660	0,2921			
Cu16	0,2130	0,2051	0,3377	0,2935	0,2668	0,1015		
Zn4	0,2008	0,3570	0,4677	0,3315	0,2607	0,1718	0,1385	
Zn6	0,2121	0,3502	0,5210	0,3602	0,3301	0,1429	0,1531	0,1244

Для визуализации выявленных различий была построена UPGMA-дендрограмма филогенетических взаимоотношений (рис. 5). На дереве образовалось два больших кластера. В первый вошли линии, созданные на низких концентрациях ионов меди (Cu2, Cu4, Cu6), сорт Изумруд *in vitro* и *in vivo*, а второй кластер образовали линии, полученные с использованием высоких концентраций ионов меди (Cu14, Cu16) и ионов цинка (Zn4, Zn6).

Следует отметить, что генетические различия внутри первого кластера значительно выше, чем во втором: наибольшее значение между парой Cu2/Cu4 – 0,3589, а между парой Cu14/Zn4 – 0,1718 (табл. 2). Уровень генетических различий между кластерами может быть описан наибольшим значением, выявленным в паре Cu2/Cu14 – 0,4969.

Топология дендрограммы дает возможность предположить

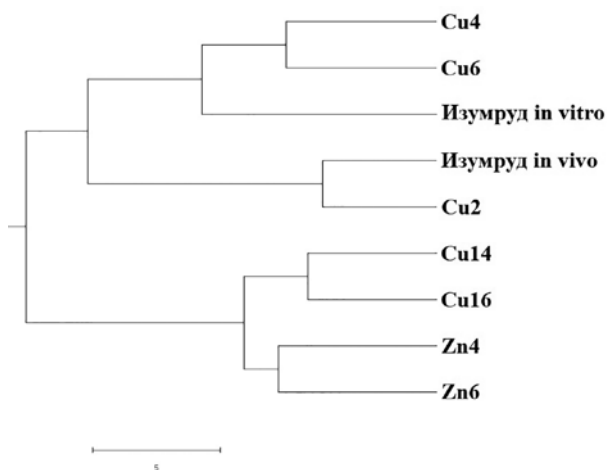


Рис. 5. UPGMA-дендрограмма филогенетических взаимоотношений исследованных линий, сорта Изумруд *in vitro* (исходная форма) и *in vivo* (стандарт). Длина ветвей дерева отражает уровень различий исследованных линий

природу выявленной в исследовании изменчивости. Вероятно, относительно низкие концентрации ионов меди индуцировали различия на уровне внутрисортовой изменчивости сорта Изумруд. Об этом свидетельствует образование двух подкластеров. Один образован растениями исходной формы Изумруд *in vitro* с регенерантами Cu4 и Cu6, а второй – растениями сорта Изумруд *in vivo* и регенерантной линией Cu2. При этом уровень изменчивости *in vivo* значительно выше ( $P = 30,26\%$ ), чем *in vitro* ( $P = 19,74\%$ ). Пробирочная популяция образована ограниченным числом генотипов и носит характер клоновой.

Использованные в экспериментах ионы меди и цинка в высоких концентрациях индуцировали большие различия в сравнении с исходной формой (Изумруд *in vitro*). В результате линии растений-регенерантов, полученные в условиях ионного стресса, образовали отдельный кластер. Внутри кластера линии растений, толерантные к меди и цинку, имели минимальные различия.

Для более полного анализа построена дендрограмма индивидуальных образцов, участвующих в исследовании с использованием алгоритма UPGMA (рис. 6). В целом топология дендрограммы под-

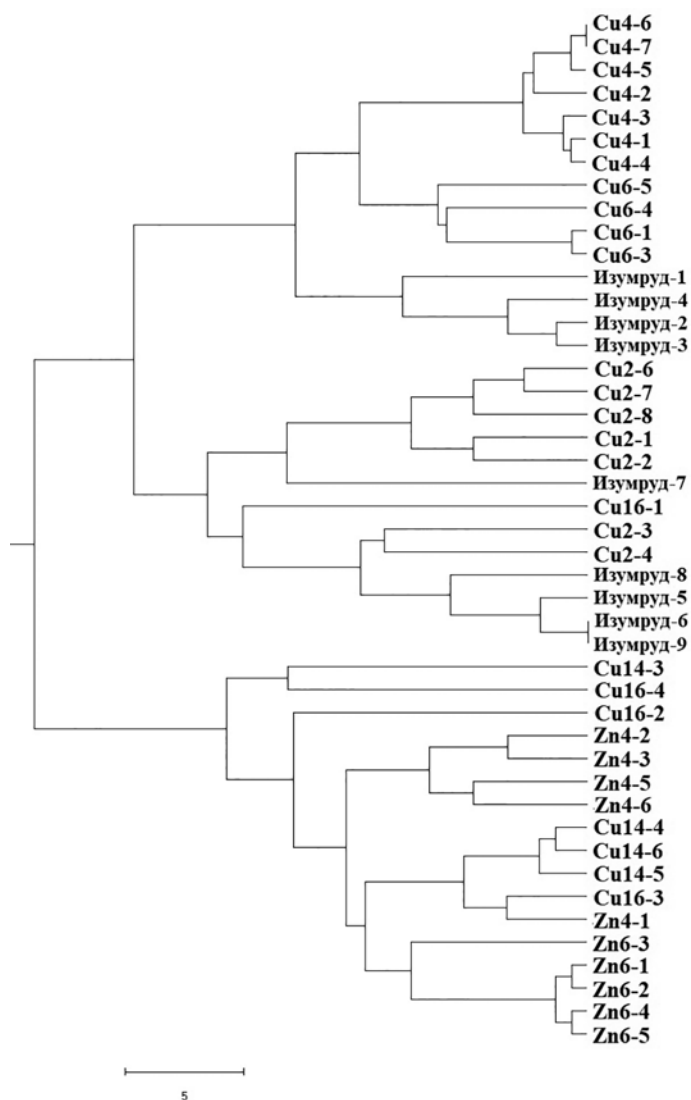


Рис. 6. UPGMA-дендрограмма филогенетических взаимоотношений отдельных образцов исследованных линий, сорта Изумруд *in vitro* (образцы Изумруд 1–4) и *in vivo* (образцы Изумруд 5–9)

тверждает полученные данные, но при этом представляет дополнительную информацию для понимания картины распределения изменчивости. В результате выделяются два больших кластера, образованных растениями тех же линий, что и в первом случае, однако количество и содержание подкластеров несколько иное. Популяция микрорастений сорта Изумруд (образцы Изумруд 1–4), растения-регенеранты линий Cu4 (Cu4-1, 2, 3, 4, 5, 6) и Cu6 (Cu6-1, 3, 4, 5) образовали индивидуальные подкластеры на дендрограмме. Растения сорта Изумруд *in vivo* (образцы Изумруд 5–9) кластеризовались с регенерантной линией Cu2 (Cu2-1, 2) и одним образцом Cu16-1.

Во втором кластере компактные моногенные группы образовали образцы, выращенные с использованием ионов цинка, при этом отдельные образцы выпадают из общих подкластеров. Регенерантные линии, полученные на высоких концентрациях

ионов меди, распределились случайным образом как друг с другом, так и с отдельными образцами, полученными на средах с ионами цинка.

Гречиха как культура обладает высоким генетическим разнообразием. Вероятно, немаловажную роль в этом играет перекрестное опыление. Так, по данным Г.Д. Кадыровой с соавторами [6], внутривидовое разнообразие гречихи посевной находится на уровне изменчивости природных популяций видов *F. cumosum* и *F. tataricum*, а в некоторых случаях превосходит ее. Ранее с использованием набора ISSR-праймеров нами были выявлены высокие уровни внутривидового полиморфизма у пяти сортообразцов гречихи посевной [22].

Молекулярно-генетические исследования подтверждают, что использование селективных сред с ионами цинка и высокими концентрациями ионов меди приводит к индуцированию наиболее значительных генетических различий, в отличие от сред с низкими концентрациями меди. Однако это разнообразие носит скорее случайный характер и обладает меньшими максимальными значениями. Кроме того, не все регенерантные линии одинаково отзываются на такое воздействие, так как у одного образца (Cu16-1) выявлен генотип, сходный с генотипом растения сорта Изумруд *in vivo* и регенерантами Cu2. Низкие концентрации ионов меди индуцируют разнообразие, сходное по уровню изменчивости с внутрисортным полиморфизмом. Это может быть следствием особенностей биологии исследуемой культуры (а именно, перекрестного опыления), большого количества разных биотипов в популяции сорта, что приводит к росту изменчивости популяции по сравнению с самоопыляющимися культурами. Следует отметить явное влияние ионов тяжелых металлов как мутагенного фактора, поскольку полученные линии кластеризуются отдельно от исходной формы, изменчивость которой можно оценивать в том числе как соматоклонную, так как она не подвергалась воздействию ионов тяжелых металлов.

## Заключение

Использование селективных сред с высокими концентрациями ионов цинка и меди для культивирования микропобегов гречихи посевной способствовало расширению диапазона генетической изменчивости и получению регенерантов с повышенным содержанием рутина. В результате ISSR-анализа регенерантных линий, толерантных к разным концентрациям ионов меди и цинка, выявлено 76 ампликонов, 67 из которых оказались полиморфными. Наибольшими генетическими различиями характеризовались пары линий Cu2/Zn6 – 0,5210, Cu2/Cu14 – 0,4969 и Cu2/Zn4 – 0,4677. Максимальное содержание рутина выявлено у растений-регенерантов Cu16 – 2,77 %, полученных в селективной среде с концентрацией сульфата меди 184 мг/л и Zn4 – 2,83 % при концентрации сульфата цинка 404 мг/л. Результаты исследований свидетельствуют о перспективности использования клеточной селекции в культуре *in vitro* гречихи для получения регенерантных линий с повышенным содержанием рутина.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Барсукова Е.Н., Клыков А.Г., Чайкина Е.Л. Использование метода культуры ткани для создания новых форм *Fagopyrum esculentum* Moench // Рос. с.-х. наука. 2019. № 5. С. 3–6. DOI: 10.31857/S2500-2627201953-6.
2. Барсукова Е.Н. Клеточная селекция гречихи посевной в условиях ионного стресса // Аграр. Россия. 2013. № 10. С. 2–4.
3. Высочина Г.И. Фенольные соединения в систематике и филогении семейства гречишных. Новосибирск: Наука, 2004. 240 с.
4. Гумерова Е.А., Акулов А.Н., Румянцева Н.И. Влияние метилжасмоната на ростовые характеристики суспензионной культуры гречихи татарской и накопление в ней фенольных соединений // Физиология растений. 2015. Т. 62, № 2. С. 212–221. DOI: 10.7868/S0015330315020074.
5. Запромтов М.Н. Фенольные соединения: распространение, метаболизм и функции в растениях. М.: Наука, 1993. 272 с.



6. 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. № 5. С. 42–48.
7. Казанцева В.В., Гончарук Е.А., Фесенко А.Н., Широкова А.В., Загоскина Н.В. Особенности образования фенольных соединений в проростках гречихи (*Fagopyrum esculentum* Moench) различных сортов // Сельскохозяйственная биология. 2015. Т. 50, № 5. С. 611–619. DOI: 10.15389/agrobiology.2015.5.611 rus.
8. Клыков А.Г., Моисеенко Л.М., Горовой П.Г. Биологические ресурсы видов рода Гречиха (*Fagopyrum* Mill.) на российском Дальнем Востоке. Владивосток: Дальнаука, 2018. 304 с.
9. Клыков А.Г., Барсукова Е.Н., Чайкина Е.Л., Анисимов М.М. Перспективы и результаты селекции *Fagopyrum esculentum* Moench на повышенное содержание флавоноидов // Вестн. ДВО РАН. 2019. № 3. С. 5–16. DOI: 10.25808/08697698.2019.205.3.001.
10. Макаренко О.А., Левицкий А.П. Физиологические функции флавоноидов в растениях // Физиология и биохимия культ. растений. 2013. Т. 45, № 2. С. 100–112.
11. Машковский М.Д. Лекарственные средства. 16-е изд., перераб., испр. и доп. М.: Новая волна, 2012. 1216 с.
12. Сабитов А.М., Магафурова Е.Ф., Хуснутдинов В.В. О новых направлениях селекции гречихи в Башкирском НИИСХ // Достижения науки и техники АПК. 2010. № 3. С. 20–22.
13. Сельскохозяйственная биотехнология: учебник. 2-е изд., перераб. и доп. / В.С. Шевелуха, Е.А. Калашникова, Е.С. Воронин и др.; под ред. В.С. Шевелухи. М.: Высш. шк., 2003. 469 с.
14. Сергеева Л.Е., Бронникова Л.И. Ионы тяжелых металлов *in vitro*: новые идеологии для получения генетически измененных форм растений // Вестн. защиты растений. 2016. № 3 (89). С. 152–153.
15. Сергеева Л.Е., Бронникова Л.И. Клеточная селекция с ионами тяжелых металлов: новые аспекты комплексной устойчивости // Биология клеток растений *in vitro* и биотехнология: сб. тез. X Междунар. конф., Казань, 1–10 окт. 2013. Казань, 2013. С. 82–83.
16. Соколов О.А. Качество урожая гречихи. М.: ОНТИ НЦБИ АН СССР, 1983. 264 с.
17. Способ размножения гречихи *in vitro*: пат. 2538167 RU, МПК А01 4/00 / Барсукова Е.Н.; патентообладатель ПримНИИСХ РАСХН. № 2013135431; заявл. 26.07.2013; опубл. 10.01.2015, Бюл. № 1.
18. Aljanabi S.M., Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques // Nucleic Acid. Res. 1997. Vol. 25, N 22. P. 4692–4693. DOI: 10.1093/nar/25.22.4692.
19. Backeljau T., De Bruyn L., De Wolfe H., Jordaens K., Van Dongen S., Winnepenninckx B. Multiple UPGMA and Neighbor-joining trees and the performance of some computer packages // Mol. Biol. Evol. 1996. Vol. 13, N 2. P. 309–313. DOI: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025590.
20. Gilbert J.E., Lewis R.V., Wilkinson M.J., Caligari P.D.S. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections // Theor. Appl. Genet. 1999. Vol. 98. P. 1125–1131. DOI: 10.1007/s001220051176.
21. Joshi S.P., Gupta V.S., Aggarwal R.K., Ranjekar P.K., Brar D.S. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* // Theor. Appl. Genet. 2000. Vol. 100. P. 1311–1320. DOI: 10.1007/s001220051440.
22. Klykov A.G., Fisenko P.V., Chibizova A.S., Barsukova E.N. Evaluation of genetic diversity of *Fagopyrum esculentum* Moench variety using method of ISSR-analysis // Current Challenges in Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics, and Biotechnology: Proc. Fifth Intern. Sci. Conf. PlantGen–2019, Novosibirsk, June 24–29, 2019. Novosibirsk: ICG SB RAS, 2019. P. 49–50. DOI: 10.18699/ICG-PlantGen2019-14.
23. Nei M. Genetic distance between populations // Am. Naturalist. 1972. Vol. 106, N 949. P. 283–292.
24. Prevost A., Wilkinson M.J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars // Theor. Appl. Genet. 1999. Vol. 98, N 1. P. 107–112. DOI: 10.1007/s001220051046.
25. Sica M., Gamba G., Montieri S., Gaudio L., Aceto S. SSR markers show differentiation among Italian population *Asparagus acutifolius* L. // BMC Genetics. 2005. Vol. 6. P. 17. DOI: 10.1186/1471-2156-6-17.