

ПОЛУЧЕНИЕ УДВОЕННЫХ ГАПЛОИДОВ ПАСТЕРНАКА В КУЛЬТУРЕ МИКРОСПОР IN VITRO

Бюртц Т. С., Домблидес Е. А.

ФГБНУ Федеральный Научный Центр Овощеводства
tajtza@yandex.ru

Пастернак посевной (*Pastinaca sativa* L.) – двулетнее перекрестноопыляемое растение относится к семейству Сельдерейные (*Apiaceae*). В первый год жизни образует корнеплод и прикорневую розетку листьев, во второй – цветonoсные побеги и дает семена. Уникальной особенностью этой овощной культуры, отличающей ее от других представителей семейства, является ее уникальный биохимический состав, характеризующийся высоким содержанием аминокислот. Пастернак, в сравнении с другими корнеплодными культурами, отличается узким генетическим разнообразием и не большим количеством сортов (в Государственном реестре селекционных достижений, допущенных к использованию на 2023 год зарегистрировано 12 сортов). Для ускоренного создания гибридов необходимо применение современных биотехнологических методов, позволяющих использовать ресурс гаметоклональной изменчивости и получать чистые линии за одно поколение. Наиболее перспективным является использование технологии культивирования изолированных микроспор из-за отсутствия соматических тканей в культуре *in vitro*, большей эффективности и меньшей трудоемкости.

Исследования проводили на двух ценных селекционных образцах пастернака из коллекции лаборатории селекции и семеноводства столовых корнеплодов ФГБНУ ФНЦО.

Было отмечено, что развитие микроспор пастернака посевного происходит аналогично развитию микроспор моркови столовой. Для успешной индукции эмбриогенеза в культуре изолированных микроспор *in vitro* отбирали плотно закрытые бутоны из крайнего ряда зонтичков центрального соцветия, имеющего слабо вогнутую, либо почти плоскую форму и содержащих преимущественно микроспоры на поздней вакуолизированной стадии развития. Размер микроспор пастернака на этой стадии развития составляет 22-29 мкм в длину (в зависимости от генотипа, положения соцветия и условий выращивания донорного растения), в то время как у моркови столовой микроспоры на аналогичной стадии достигали 18 - 22 мкм.

Микроспоры культивировали на модифицированных питательных средах NLN-13 и MSm-13. Первые деления в культуре отмечали уже на 3 день культивирования в темноте при 25°C, а после 10-14 дней культивирования уже можно было наблюдать многоклеточные образования в пределах оболочки пыльцевого зерна. Эмбриониды достигал семязольной стадии развития к 45-50 дню культивирования.

Процесс регенерации растений из эмбрионидов пастернака посевного на регенерационной питательной среде с мостиками, разработанной для моркови (жидкая MSm с 0,1 кинетина). Этот процесс протекает на 2-3 недели дольше по сравнению с морковью. В процессе регенерации развивающиеся растеньица, в отличие от моркови столовой, необходимо переносить на свежую питательную среду каждые 14 дней, иначе происходит побурение их окраски и они погибают. Только из 40% эмбрионидов удалось регенерировать растения.

Полученные растения – регенеранты, адаптированные к условиям *ex vitro* были оценены на уровень ploидности с использованием проточной цитометрии клеточных ядер. В изученной выборке образцов присутствовали гаплоидные и диплоидные растения. Присутствие регенерантов с диплоидным набором хромосом свидетельствует о возможности процесса спонтанной диплоидизации при нахождении в культуре *in vitro* у части гаплоидных образцов, полученных из мужского гаметофита, а для гаплоидных растений регенерантов, необходимо разрабатывать этап технологии по индуцированному увеличению ploидности с использованием антимитотических веществ.

Ключевые слова: удвоенные гаплоиды, эмбриониды, культура микроспор.

OBTAINING DOUBLED PARSNIP HAPLOIDS IN MICROSPORE CULTURE IN VITRO

Vjurtts T. , Domblides E. A.
FSBSI Federal Scientific Vegetable Center
tajtza@yandex.ru

Apiaceae family (Umbelliferae). During the first year of life, it forms a root and leaf rosette. During the second year, flower-bearing shoots are formed. A unique feature of this vegetable crop distinguishing it from other representatives of the family is its unique biochemical composition, characterized by a high content of amino acids. In comparison to other crops, parsnip is characterized by a narrow genetic diversity and limited number of varieties (12 varieties are registered in the Russian State Register of breeding achievements allowed for use in 2023). For accelerated hybrid breeding it is necessary to use modern biotechnological methods that allow using gametoclonal variability to obtain pure lines in one generation. The most promising approach is the isolated microspore cultivation technology due to the absence of somatic tissue *in vitro* culture, higher efficiency and lower labor intensity.

The research was conducted on two valuable parsnip breeding accessions from the collection of the laboratory of root crop breeding and seed production of FSBSI "Federal Scientific Vegetable Center".

It was observed that parsnip microsporogenesis is similar to carrot microspore development. For successful induction of embryogenesis in isolated microspore culture *in vitro*, tightly closed buds were selected from the outermost row of umbellet of the central inflorescence, having a slightly concave or almost flat shape and containing mainly microspores at the late vacuolated stage. The length of parsnip microspores at this stage of development is 22-29 μm (depending on the genotype, inflorescence position, and growing conditions of the donor plant), while carrot microspores reached 18 – 22 μm at a similar stage.

Microspores were cultured on modified nutrient media NLN-13 or MSm-13. The first divisions in the culture were observed on the 3rd day of cultivation at 25°C in the dark. After 10-14 days of cultivation multicellular formations within the pollen grain shell could be observed. Embryoids reached the cotyledon stage by 45-50 days of cultivation.

Parsnip embryoid development into plantlets occurred on filter paper bridges immersed in the liquid regeneration MSm medium with 0.1 mg/L kinetin. This process took 2-3 weeks longer compared to carrot.

Unlike carrots, developing parsnip plantlet should be transferred to fresh nutrient medium every 14 days to prevent their darkening and dying out. Only 40% of embryoids regenerated into plants.

The obtained regenerants adapted to *ex vitro* conditions were evaluated for ploidy level using flow cytometry. Haploid and diploid plants were detected. The presence of regenerants with diploid set of chromosomes indicates the possibility of partial spontaneous diploidization during *in vitro* culture. For haploid regenerant plants, it is necessary to develop a genome doubling protocol using antimitotic substances.

Keywords: doubled haploids, embryoids, microspore culture.