


ЕЛАБОРАТ
Научно-истражувачки проект



НАСЛОВ НА ПРОЕКТОТ:
СОЗДАВАЊЕ НА ХАПЛОИДНА ПИПЕРКА
(*Сарсиум апиум* L.) ВО *IN VITRO* УСЛОВИ

ИНСТИТУЦИЈА:
ЈНУ „ИНСТИТУТ ЗА ЈУЖНИ ЗЕМЈОДЕЛСКИ КУЛТУРИ,
СТРУМИЦА

ГЛЕВЕН ИСТРАЖУВАЧ:
Д-р ЛИЛЈАНА КОЛЕВА-ГУДЕВА

Траење на проектот: 01.01.2004 - 31.12.2006

Елаборатот е составен дел на образецот ОБ-3 Завршен извештај на проектот

СОДРЖИНА

КРАТЕНКИ	3
КРАТКА СОДРЖИНА НА ПРОЕКТОТ	4
а) на македонски јазик	4
б) на англиски јазик.....	5
Клучни зборови (на македонски и англиски јазик)	8
1. ВОВЕД	9
1.1. Цели на истражувањето	11
2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА	12
3. МЕТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА РАБОТА	14
3.1. Стерилизација на пупки од <i>C. annuum</i> L. и изолирање на антери	14
3.2. Одредување на стадиумот на микроспорите	15
3.3. Состав на подлогите за култивирање на антерите.....	16
3.4. Услови за одгледување на културите	21
3.5. Квантитативно одредување на содржината на капсаицин	21
3.6. Статистичка обработка на податоци	22
4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА	23
4.1. Резултати од истражувањата во 2004 година	23
4.2. Резултати од истражувањата во 2005 година.....	26
4.3. Резултати од истражувањата во 2006 година.....	28
4.4. Резиме од истражувањата 2004-2006	33
5. ЗАКЛУЧОЦИ.....	35
6. ПУБЛИКАЦИИ КОИ ПРОИЗЛЕГУВААТ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО	37
7. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА.....	40
8. ПРИЛОГ оригинални фотографии од истражувањето.....	43

КРАТЕНКИ

- **BA** N⁶ - бензиладенин
- **BAP** N⁶ - бензиламинопурин
- **2iP** N⁶ -2- изопентил аденин
- **2,4-D** 2,4 - дихлорфенокси оцетна киселина
- **GA₃** гиберелинска киселина
- **IAA** индолил-3-оцетна киселина
- **IBA** индолил-3-бутерна киселина
- **KIN** кинетин, 6 - фурфурил amino пурин
- **NAA** 1-нафтален-оцетна киселина
- **MS медиум** (Murashige и Skoog, 1962)
- **LS медиум** (Linsmaer и Skoog, 1965)
- **N медиум** (Nitch, 1969)
- **NN медиум** (Nitch и Nitch, 1969)
- **CP медиум** (Dumas de Valux et al., 1981)
- **R₁ медиум** (Dumas de Valux et al., 1981)
- **R₂ медиум** (Dumas de Valux et al., 1981)
- **V₃ медиум** (Dumas de Valux et al., 1981)
- **SPSS** Statistical Package for the Social Sciences
компјутерска програма за статистика
- **±S.D.** стандардна девијација
- **p** праг на сигнификантност (p<0,05)

КРАТКА СОДРЖИНА НА ПРОЕКТОТ

а) на македонски јазик

Микропропагацијата на градинарски растенија со методот култура на растителни клетки и ткива во услови *in vitro*, има широка примена во создавањето на висококвалитетни сорти и хибриди, создавање на сорти отпорни на разни заболувања, креирање на хаплоиди како и стабилизација и подобрување на генетската структура на видовите. Новите и модерни биотехнолошки методи и техниките на биоинжинерингот дозволуваат подобрување, создавање, и селекција на сорти кои со традиционалниот начин на одгледување не може да се добијат.

Видовите на *Capsicum annuum* L. се најраспространети, најбројни и најразновидни по форма, боја и лутина во целиот растителен свет, затоа привлекуваат големо внимание во научноистражувачката работа.

Цел на истражувањата во овој проект е да се испита органогентскиот потенцијал, способноста за андрогенеза и формирање на хаплоидни ембриониди, во култури *in vitro* на пиперка (*Capsicum annuum* L.).

Андрогентскиот потенцијал на пиперката, во Република Македонија, воопшто не е истражуван, а добиените регенеранти се првите хаплоиди од пиперка во државата, создадени во услови *in vitro*. Овие резултати и методи ќе послужат како патоказ за примената на андрогенезата за добивање хаплоиден генофонд на многу различни растителни видови како и нивната понатамошна селекција.

Цел на истражувањата, во овој проект, беше да се постигне ефективна *in vitro* технологија за проучување на хаплоидни и дихаплоидни растенија-регенеранти; индукција на ембриогенеза во култура на антери од пиперка *in vitro*; развој на ембрионидите во регенеранти, како и успешна адаптација и аклиматизација на добиените регенеранти од стерилни во оранжериски услови. Во текот на тригодишните истражувања е испитуван андрогенетскиот потенцијал и способноста за соматска ембриогенеза во култура на антери од пиперка во *in vitro* услови кај деветнаесет (19) различни генотипови на пиперка. Индуцирана е соматска ембриогенеза во култури на антери кај дванаесет генотипови, од сите испитувани генотипови на пиперка.

Андрогенезата, која се одвива во услови *in vitro*, е најнова и најсигурна метода за добивање на хаплоидни единки, каде вегетативното или генеративното јадро од поленовото зрно се стимулира да се развие во хаплоидна индивидуа, без понатамошно оплодување. Често овој феномен е ограничен на само еден генотип или вариетет, а причината за оваа рестриktivна појава за жал е сè уште непозната.

За да се стимулира процесот на андрогенеза во културата на антери од пиперка беа користени повеќе различни индукциони медиуми а исто така беа користени и соодветени инкубациони третмани (стрес-третмани), со следните хормонални комбинации:

- **MS** + 1.0 mg/l KIN + 0.01 mg/l 2,4 D + 0,001 mg/l IAA, со инкубација на темно 7 дена и на +25±2°C, а потоа во клима комора на +25±2°C, со фотопериодизам од 12 часа светло и 12 часа темно (George и Narayanaswamy, 1973);
- **N** + 1.0 mg/l KIN + 0.001 mg/l IAA, со инкубација на темно 7 дена и на +25±2°C, а потоа во клима комора на +25±2°C, со фотопериодизам од 12 часа светло и 12 часа темно (George и Narayanaswamy, 1973);
- **LS** + 3.0 mg/l KIN + 1.0 mg/l IAA, со инкубација на темно 7 дена и на +7±2°C, а потоа во клима комора на +25±2°C, со фотопериодизам од 12 часа светло и 12 часа темно (Dolcet-Sanjuan et al., 1997);
- **NN** + 0.01 mg/l KIN + 0.001 mg/l 2,4D, со инкубација на темно 7 дена и на +7±2°C, а потоа во клима комора на +25±2°C, со фотопериодизам од 12 часа светло и 12 часа темно (Dolcet-Sanjuan et al., 1997);
- **CP** + 0.01 mg/l KIN + 0.01 mg/l 2,4D, со инкубација на темно 8 дена и на +35±2°C, следните 4 дена во клима комора на +25±2°C со фотопериодизам 12 часа светло / 12 часа темно, а потоа на **R₁** + 0.01 mg/l KIN на +25±2°C, со фотопериодизам 12 часа светло и 12 часа темно.

Како најповолен стрес-третман се покажа методот на Dumas de Valux et al. (1981), на кој медиум единствено беше добиена индукција на соматски ембриониди а калусирањето отсутствуваше или беше минимално.

По успешната аклиматизација на регенерантите во оранжериски услови колекциониран е семенски материјал од четири генотипови на пиперка и тоа: *пиран*, *куртовска капија СР*, *златен медал СР* и *фехерозон*. Колекционираниот семенски материјал претставува одлична можност за вклучување на истиот во селекционите процеси на пиперката, како и база за понатамошни цитогенетски и други истражувања на молекуларно ниво.

б) на англиски јазик

Micropropagation of agricultural crops with the method of plant tissue culture in *in vitro* conditions is widely used for creation of high quality varieties and hybrids, for creation varieties resistant to different diseases, creation of haploids as well as for stabilization and improvement genetic structure of the species.

The species of *Capsicum annuum* L. are the most spread, the largest numbered and the most varied in shape, color and pungency of the whole plant kingdom, therefore it attracts large interest in scientific research.

The aim of this project was to examine the organogenetic potential, the ability of androgenesis and haploid embryoides formations in the tissue culture of pepper (*Capsicum annuum* L.).

Till now, successful regeneration of the varieties Kurtovska kapija and Golden medal from apical buds in *in vitro* conditions has been done and the regenerative potential of cotyledons segments of these two varieties has been examined.

Considering the fact that in the Republic of Macedonia the androgenetic potential of pepper is not examined, produced regenerants are the first pepper haploids obtained from *in vitro* conditions. Therefore, the results could be used as a way for practical improvement of haploid production for many other different species.

The aim of this study was achievement of an effective *in vitro* technology for study of haploid and dihaploid plants - regenerants; *in vitro* embryogenic induction in another culture of pepper; development of embryos into regenerants and their successful

adaptation and acclimatization from sterile to greenhouse conditions. The androgenic potential and the ability for somatic embryogenesis in anther culture of pepper *in vitro* in nineteen different pepper genotypes were investigated during three years research period. From all nineteen pepper genotypes under investigation somatic embryogenesis was induced in anther culture of twelve genotypes.

Androgenesis, which is conducted *in vitro* conditions, is one of the newest and most assured methods for production of haploid plants where the vegetative and the generative nucleus from the pollen grain is stimulated to be developed in haploid plant without further fertilization. This phenomenon very often is restricted to one genotype or variety and the reason unfortunately is still unknown.

Different induction media and incubation treatments (stress-treatments) with following combinations were used in order the process of androgenesis to be stimulated in anther culture of pepper:

- **MS** + 1.0 mg/l KIN + 0.01 mg/l 2,4 D + 0.001 mg/l IAA, by incubation in darkness for 7 days at $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ and than in clime chamber at $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ with photoperiodism 12 h light and 12 h dark (George and Narayanaswamy, 1973);
- **N** + 1.0 mg/l KIN + 0.001 mg/l IAA, by incubation in darkness for 7 days at $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ and than in clime chamber at $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ with photoperiodism 12 h light and 12 h dark (George and Narayanaswamy, 1973);
- **LS** + 3.0 mg/l KIN + 1.0 mg/l IAA, by incubation in darkness for 7 days at $+7\pm 2^{\circ}\text{C}$ and than in clime chamber at $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ with photoperiodism 12 h light and 12 h dark (Dolcet-Sanjuan et al., 1997);
- **NN** + 0.01 mg/l KIN + 0.001 mg/l 2,4D, by incubation in darkness for 7 days at $+7\pm 2^{\circ}\text{C}$ and than in clime chamber at $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ with photoperiodism 12 h light and 12 h dark (Dolcet-Sanjuan et al., 1997);
- **CP** + 0.01 mg/l KIN + 0.01 mg/l 2,4D, by incubation in darkness for 8 days at $+35\pm 2^{\circ}\text{C}$, the next 4 days in clime chamber at $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ with photoperiodism 12 h light and 12 h dark and than on **R₁** + 0.01 mg/l KIN at $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$ with photoperiodism 12 h light and 12 h dark (Dumas de Valux et al., 1981).

The most favorable stress treatment was the method of Dumas de Valux et al. (1981) where the induction of somatic embryos were successful while the callus formation did not occurred at all or it was minimal.

After successful acclimatization of regenerants in greenhouse conditions, seed material was collected from four pepper genotypes: Piran, Kurtovska kapija SR, Zlaten medal SR and Feherozon. The collected seed material is excellent possibility for future pepper breeding processes and a base of further cytogenetic and molecular researches.

КЛУЧНИ ЗБОРОВИ

На македонски јазик:

Андрогенеза, култура на антери, *in vitro*, инкубациски третмани, пиперка (*Capsicum annuum* L.)

На англиски јазик

Androgenesis, anther culture, *in vitro*, incubation treatments, pepper (*Capsicum annuum* L)

1. ВОВЕД

Андрогенезата, која се одвива во услови *in vitro*, е најнова и најсигурна метода за добивање на хаплоидни единки, каде вегетативното или генеративното јадро од поленовото зрно се стимулира да се развие во хаплоидна индивидуа, без понатамошно оплодување (Слика 2 и 3). Иако е возможна андрогенезата од многу видови на земјоделски култури и дрва, способноста на секој вид за успешна пропација на микроспори, често е ограничена на само еден генотип или вариетет. Причината за оваа рестриктивна појава е непозната, и за жал успешните генотипови немаат комерцијално значење.

Со сексуалната генеративна репродукција бројот на хромозомите се редуира на половина, како резултат на мејозата, а се дуплира повторно со опрашувањето (со фузија на женски и машки гамети). Ако мејозата се случува во диплоидно растение со 2 пара на хромозоми ($2n=2x$), тогаш се добиваат клетки чии хромозоми се со $n=x$. Ако од таква клетка $n=x$ се добие цело растение без опрашување, тогаш се добива монохаплоидно растение, кое има само еден пар на хромозоми (x) (Pierik, 1998) (Слика 4).

Слично е и со тетраплоидните растенија со 4 пара на хромозоми ($2n=4x$), а со мејозата се добиваат клетки со $2n=2x$ хромозоми. Ако пак, од овие клетки се формира растение без опрашување се добиваат дихаплоиди. Генерално гледано хаплоидни клетки или растенија се оние во кој оригиналниот број на хромозоми е намален на половина.

Генетичарите и одгледувачите имаат голем број потешкотии во добивањето на хаплоидни растенија. Бројот на растителните видови кај кои хаплоиди спонтано се добиваат *in vivo* е само нешто повеќе од 100, но ова како правило во природата е сосема ретко. Кај пиперката (*Capsicum annuum* L.) единствен тип на експлантати, кои формираат соматски ембриониди се антери, незрели зиготски ембриониди и калус добиен од незрели зиготски ембриониди.

Андрогенезата, која се одвива во услови *in vitro*, е најнов и најсигурен метод за добивање на хаплоидни единки, каде вегетативното или генеративното јадро од поленовото зрно се стимулира да се развие во хаплоидна индивидуа, без понатамошно оплодување

Со изолирање и поставување на антери во услови *in vitro*, хаплоиди може да се добијат на два начини и тоа директно и индиректно (Pierk, 1998):

-Директно, кога ембриоиди се формираат директно од поленовото зрно (микроспората);

-Индиректно, кога прво се развива калус од поленовите зрна т.е. микроспорите, потоа се формираат хаплоидни ембриоиди или адвентивни изданоци, па на крај регенеранти. Овој тип на развој обично не е поволен затоа што калусот како стартен материјал има хетерогенетска природа (хаплоиди и диплоиди), каде можат да се јават спонтани промени од хаплоиди во диплоиди.

Хаплоидните растенија се идеален материјал за испитувања од областа на генетиката и селекцијата на растенијата. Од друга страна, честотата на спонтаното добивање на хаплоиди по природен пат кај земјоделските култури е многу ниска од 10^{-6} до 10^{-3} . Затоа, една од поважните методи во областа на *in vitro* култивирање на растителните видови е и токму создавањето на голем број на хаплоидни и дихаплоидни единки за краток временски период. Овие хаплоиди/дихаплоиди би биле понатаму основа за генетички т.е. цитогенетски испитувања кои би ја оправдале целокупната постапка.

За индукција на соматската ембриогенеза во култура на антери, како и за зголемена продукција на хаплоиди, се користат различни стрес третмани или инкубациски третмани.

Изборот на третманот кој би се употребил за секој нов генотип или вид може да се заснова само на консултираната обемна литература за култура на антери, во комбинација со сознанијата за регенерација на соодветниот генотип или вид (Collin и Edwards, 1998).

1.1. Цели на истражувањето

Цел на овие истражувања беше да се испита влијанието на три различни инкубациски методи, според George и Narayanaswamy (1973); Dolcet-Sanjuan et al. (1997) и според методот на Dumas de Valux et al. (1981), врз индукцијата на калус и формирањето на хаплоидни ембриониди во култура од антери на пиперка.

Во текот на реализацијата на проектот како специфични цели беа: да се постигне ефективна *in vitro* технологија за проучување на хаплоидни и дихаплоидни растенија-регенеранти; да се индуцира соматска ембриогенеза во култура на антери од пиперка *in vitro*; да се следи развојот на соматските ембрионидите во регенеранти; успешно да се адаптираат и аклиматизираат добиените регенеранти од стерилни на оранжериски услови; да се испита регенеративниот потенцијал на *Capsicum annuum* L. во *in vitro* услови, особено способноста за андрогенеза, како и да се испита влијанието на различниот хормонален состав на хранливиот медиум и индуцираниот стрес-третман врз андрогенетскиот потенцијал во култура на антери од различни генотипови на пиперка.

Воедно, предмет на истражувањата беше и да се прошират знаењата за андрогенезата, да се испита морфогенезата и улогата на растителните регулатори на растот, особено на ауксините и цитокинините, врз процесот на соматска ембриогенеза во услови *in vitro*. Испитувањата се изведени со деветнаесет (19) различни генотипови на пиперка, кои се разликуваат по потеклото на производство и по лутина.

Во текот на тригодишните истражувањата за одредување на можноста за андрогенеза и органогенеза, како и за влијанието на капсаицинот како инхибиторен фактор врз андрогенетскиот потенција, беа поставени и во целост реализирани следните задачи:

- испитување и определување на оптимални услови за успешна стерилизација на цветни пупки од пиперка;

- изолирање на антери, кои содржат микроспори во стадиум на прва поленова митоза, од стерилизирани млади цветни пупки на пиперка;
- поставување на култура на антери од 19 различни генотипови на пиперка во *in vitro* услови;
- проучување на влијанието на составот на хранливата подлога и растителните регулатори врз степенот на андрогенезата кај пиперка;
- одредување на андрогенетскиот потенцијал и способноста за формирање на соматски ембриониди за секоја генотип;
- индукција на калусогенеза од антери;
- индукција на ембриогенеза и формирање на хаплоидни ембриониди кај испитуваните генотипови на пиперка;
- проучување на развојот и адаптацијата на добиените хаплоидни ембриониди во млади изданоци во култура;
- аклиматизација на регенерираните растенија од стерилни на асептички услови т.е. прво во клима комора а потоа во оранжериски услови;
- испитување на влијанието на капсаицинот како можеен инхибиторен фактор во процесот на андрогенезата во *in vitro* услови;
- колекционирање на семенски материјал добиен од растенијата регенерирани од култура на антери на пиперка.

2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА

Најраните истражување за соматска ембриогенеза на пиперка (*Capsicum annuum* L.) се на полето на андрогенеза со култура на антери и тоа: 1973, Kuo, Wang, Chein, Ku, Kung и Hsu; 1973, George и Narayanaswamy; 1977, Saccardo и Devreux; 1979, 1980, Sibi, Dumas de Valux и Chambonet; 1981, Dumas de Valux, Chambonet и Porchard; 1989, Munyon, Hubstenberger и Phillips; 1992, Matsabura et al.; 1992, Park et al.; 1993 Qin и Rotino, но добиените регенеранти главно биле мешавина од хаплоиди и диплоиди растенија (Kararakis, 1999). Користени се разни стрес третмани со цел да се зголеми соматската ембриогенеза, од една страна, и да

се зголеми продукцијата на хаплоиди, од друга страна (Mityko et al., 1995; Rodeva et al., 2004; Okum and Tripirdamaz, 2002; Колева-Гудева, 2003; Ashok Kumar et al., 2003; Irikova and Rodeva, 2004).

George и Narayanaswamy (1973) ја добиле првата експериментална андрогенеза со култура на антери, кои содржеле зрели поленови зрна. Првата успешна андрогенеза на пиперка е добиена во 1981 година од Dumas de Valux, et al. Имено, со култура од антери авторот добива хаплоидни и диплоидни хибриди на пиперка, и тоа кај различни вариетети. Воедно, испитувана е и стимулацијата на андрогенезата со температурен третман, како и со различна концентрација и комбинација на повеќе фитохормони.

Од неодамна, соматска ембриогенеза на пиперка е добиена во суспензија на калусни клетки во биореактори (Buyukalaca и Mavituna, 1996), каде е докажано дека главна улога во соматската ембриогенеза има кислородот.

Денес, андрогенезата во *in vitro* услови, базирана на 30 годишно истражување, претставува ефективен метод за индукција на хаплоиди (Koleva-Gudeva et al., 2007)

Андрогенезата на пиперката е доста лимитирачки процес кој е проследен со многу инхибирачки фактори како: генотипот; структурата и стадиумот на микроспорите т.е. микроспорите се погодни за индукција на андрогенеза во фазата на првата поленова митоза или непосредно пред неа; генетската предиспозиција за соматската ембриогенеза; хормоналната регулација во *in vitro* услови; условите на раст, како и многу други фактори. Науката сè уште нема доволно објаснувања за сите познати и непознати ограничувачки фактори за овој процес кај видовите од родот *Capsicum*. Инхибиторното влијание на секундарните метаболити, особено капсаицинонот, воопшто не е истражувано, иако во литературата постојат податоци дека некои бабурести и слатки генотипови имаат поголем андрогенетски потенцијал од лутите генотипови на пиперката.

Клиничките испитувања, *in vivo* и *in vitro*, покажуваат дека биолошкиот потенцијал на капсаицинонот потекнува од неговата неверојатно силна и стабилна структура на секундарен метаболит - алкалоид, а оттаму доаѓа и неговото

повеќекратно инхибиторно дејство. За капсаициноот како инхибитор во култура *in vitro* сè уште малку се знае, а од друга страна докажано е дека лути сорти од пиперка потешко се регенерираат во *in vitro* услови за разлика од слатките сорти (Колева-Гудева, 2005).

3. МЕТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ НА РАБОТА

3.1. Стерилизација на пупки од *C. annuum* L. и изолирање на антери

За одредување на степенот на андрогензата на пиперка користени се пупки од вкупно деветнаесет различни генотипови на пиперка (сорти и популации) кои се разликуваат и по потеклото на производството и по лутината (Табела 1). Сите беа посадени во саксии во оранжериски услови, а растенијата за време на целиот вегетативен период беа редовно прихранувани, наводнувани и заштитувани од болести и штетници (Слика 5 и 6).

Табела 1. Листа на различни генотипови на пиперки користени во истражувањето 2004-2006 година.

Бр.	Шифра	Генотип пиперка	Потекло на производството
1	МК1	<i>пиран</i>	Македонија
2	МК2	<i>куртовска капија</i> ВГ	Бугарија
3	МК3	<i>куртовска капија</i> ТР	Турција
4	МК4	<i>златен медал</i> ШТ	Македонија - Штип
5	МК5	<i>куртовска капија</i> МК	Македонија - Струмица 2002
6	МК6	<i>бонбона</i>	Македонија
7	1	<i>слатко лута</i>	Македонија
8	3	<i>лута везена</i>	Македонија
9	4	<i>сиврија</i>	Македонија
10	5	<i>феферона</i>	Македонија
11	7	<i>златен медал</i> СР	Македонија - Струмица
12	8	<i>куртовска капија</i> СР	Македонија - Струмица 2000
13	9	<i>калифорниско чудо</i>	Србија
14	15	<i>фехерозон</i>	Унгарија
15	16	<i>ротунд</i>	Македонија
16	1Н	<i>притавит</i> F1	Унгарија
17	2Н	<i>доматовидна блага</i>	Унгарија
18	3Н	<i>тура</i>	Унгарија
19	4Н	<i>мајори</i>	Унгарија

Како почетен материјал користени се незрелите пупки од пиперка, кои содржат антери со микроспори во стадиум на првата поленова делба или непосредно пред делбата. Стерилизацијата на пупките се одвиваше на следниот начин: најпрво пупките се промиваат во водоводна вода; потоа следи промивање во дестилирана вода; потоа 15 секунди во 70% C_2H_5OH ; па 10 минути во 5% $Ca(ClO)_2$ со 2-3 капки Tween 20, и на крај пупките се промиваат неколкупати во стерилна вода.

Изолираните антери (Слика 7) од 3 пупки потоа се поставуваат во петриеви садови со пречник од 5 cm и тоа со конкавната страна да го допираат индуктивниот медиум. Стадиумот на делбата на микроспората е одредуван микроскопски со обојување на антерите со ацето кармин неколку минути, а потоа истите беа микроскопирани. Тоа обично е фаза на цветната пупка кога должината на цветните и венечните ливчина е еднаква и кога слободниот крај на антерата почнува да се обојува слабо виолетово (Слика 5, означено со стрелка).

3.2. Одредување на стадиумот на микроспорите

Приготвувањето на бојата (ацето кармин) за одредување на стадиумот на микроспорите се врши на следниот начин: 1 g кармин се растворува во 45 ml глацијална оцетна киселина, се додава уште 55 ml дестилирана вода, и се става на вриење околу 5 минути. Потоа, растворот се лади, се филтрира, и за интензивирање на бојата се додава 1-2 капки железенхидроксид. На изолираните антери се капнува од ацето карминот и по неколку минути истите се мацерираат на микроскопско предметно стакло и се набљудуваат во кој стадиум е микроспората (Слика 8, 11, 12). Во култура за индукција на андрогенеза се поставуваат само оние антери кои содржат микроспори во или пред првата поленова делба (Слика 8). Андрогенетскиот потенцијал беше одредуван преку степенот на калусогенеза и способноста за формирање на ембриоиди на повеќе различни хормонални подлоги со различни комбинации на фитохормони.

3.3. Состав на подлогите за култивирање на антерите

Реализацијата на проектот започна со тестирање на пет различни индуктивни медиуми со три различни стрес - третмани, со цел да се констатира кој медиум и кој стрес третман е најпогоден за андрогенезата кај пиперката. Така, во истражувачката 2004 година како индуктивни медиуми за андрогенеза беа користени и CP (Dumas de Valux et al., 1981), MS (Murashige и Skoog, 1962), LS (Linsmaer и Skoog, 1965), N (Nitch, 1969) (Слика 9) и NN (Nitch и Nitch, 1969) како двофазен медиум со носач (Слика 10). За NN медиумот носачите на антери, во вид на буквата М, беа приготвувани од стерилна филтер хартија и поставени во ерленмаерови тиквички на цврстата фаза, а течната фаза го натопува носачот од каде антерата ги прима потребните хранливи елементи и хормони. Течната и цврстата фаза се изотонични раствори, а разликата е само во агарот кој го нема во течната фаза.

Поставените антери беа инкубирани:

- 7 дена на темно и на $+25\pm 2^{\circ}$ C, а потоа во клима комора на $+25\pm 2^{\circ}$ C, 12 h светло / 12 h темно (George и Narayanaswamy 1973), на MS и N медиумите, и

- 7 дена на темно и на $+7\pm 2^{\circ}$ C, а потоа во клима комора на $+25\pm 2^{\circ}$ C, 12 h светло / 12 h темно (Dolcet-Sanjuan et al. 1997) на NN и LS медиуми;

- првите 8 дена, антерите се инкубираат, на темно и на $+35\pm 2^{\circ}$ C, а следните 4 дена во клима комора на $+25\pm 2^{\circ}$ C, 12 h светло / 12 h темно (Dumas de Valux et al., 1981) на CP медиум.

Индуктивните медиуми беа обогатени со следниот хормонален состав:

MS + 1.0 mg/l KIN + 0.01 2,4-D mg/l + 0.001 mg/l IAA ;

N + 1.0 mg/l KIN + 0.001 mg/l IAA;

LS + 3.0 mg/l KIN + 1.0 mg/l IAA;

NN + 0.01 mg/l KIN + 0.001 2,4-D;

CP + 0.001 mg/l KIN + 0.01 2,4-D.

Медиумите на Dumas de Valux et al., 1981 (дадени во табелите 3, 4 и 5) во текот на 2004 се покажаа како најповолни за андрогенеза и единствено на овој медиум беа индуцирани соматски ембриониди. Заради тоа, во текот на 2005 и 2006

година истражувањата продолжија исклучиво со користење на топол стрес-третман на +35°C на CP медиум по методот на гореспоменатиот автор.

Табела 2. Состав на LS (Linsmaer и Skoog, 1965), MS (Murashige и Skoog, 1962), N (Nitch, 1969) медиум, и на NN (Nitch и Nitch, 1969) двофазен медиум

макро и микро елементи	LS (mg/l) (Linsmaer и Skoog)	MS (mg/l) (Murashige и Skoog)	N (mg/l) (Nitch)	NN (mg/l) (Nitch и Nitch) двофазен медиум
NH ₄ NO ₃	1650.00	1 650.00	720.00	720.00
KNO ₃	1900.00	1 900.00	950.00	950.00
CaCl ₂ x 6 H ₂ O	332.02	440.00	166.00	166.00
Ca(NO) ₃ x 4 H ₂ O	-	-	500.00	-
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	180.54	370.00	185.00	185.00
KH ₂ PO ₄	170.00	170.00	6.80	6.80
H ₃ BO ₃	6.20	6.20	10.00	10.00
MnSO ₄ x H ₂ O	16.90	22.30	18.94	18.94
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	8.60	8.60	10.00	10.00
Na ₂ Mo ₄ x 2 H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25
KJ	0.83	0.83	-	-
Cu SO ₄ x 5 H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025
Co Cl ₂ x 6 H ₂ O	0.025	-	-	-
FeNaEDTA	36.70	-	36.70	36.70
Na ₂ EDTA	-	33.3	-	-
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	-	27.8	-	-
органски компоненти				
сахароза	20.00 g/l	30.00 g/l	30.00 g/l	-
малтоза	-	-	-	20.00 g/l
агар	8.00 g/l	7.00 g/l	8.00 g/l	8.00 g/l
мио инозитол	100.00 mg/l	100.00 mg/l	100.00 mg/l	100.00 mg/l
витамин B ₁	4.40 mg/l	0.1 mg/l	0.50 mg/l	0.50 mg/l
витамин B ₆	-	1.0 mg/l	0.50 mg/l	0.50 mg/l
никотинска к-на	-	0.5 mg/l	5.00 mg/l	5.00 mg/l
фолна киселина	-	-	0.05 mg/l	0.05 mg/l
глицин	-	-	2.00 mg/l	2.00 mg/l
биотин	-	-	0.05 mg/l	0.05 mg/l

Табела 3. Составот на CP, R₁, R₂ и V₃ (Dumas de Valux, et al., 1981) медиум

	CP	R ₁	R ₂	V ₃
	на литар			
SNGM макро	100 ml	100 ml	100 ml	-
MS макро	-	-	-	100 ml
Micro-2	10 ml	-	-	-
Micro-R	-	10 ml	10 ml	-
Micro-Heller	-	-	-	1 ml
F витамини	1 ml	1 ml	1 ml	-
Morel витамини	1 ml	1 ml	1 ml	2 ml
B ₁₂ витамин	0.3 ml	-	-	-
Fe – хелат	1 ml	1 ml	1 ml	2 ml
2,4-D 0.1mg/ml	0.1 ml	-	-	-
кинетин 0.1mg/ml	0.1 ml	1 ml	20 ml	-
дестилирана вода	1 000 ml	1 000 ml	1 000 ml	1 000 ml
сахароза	30 g	30 g	30 g	30 g
агар	10 g	10 g	10 g	10 g
pH	5.9	5.9	5.9	5.9

Табела 4. Состав на хранливите раствори SNGM макро, MS макро, Micro-2, и Micro Heller во медиумите по Dumas de Valux et al., (1981)

МАКРОЕЛЕМЕНТИ (mg/l)			МИКРОЕЛЕМЕНТИ (mg/l)			
	SNGM макро (10x)	MS макро (10x)		Micro -2 (100x)	Micro -R (100x)	Micro- Heller (100x)
KNO ₃	21 500	19 000	MnSO ₄ x H ₂ O	2213.0	2013.0	76.0
NH ₄ NO ₃	12 380	16 500	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	362.5	322.5	1000.0
MgSO ₄ x 7H ₂ O	4 120	3 700	H ₃ BO ₃	315,0	155.0	1000.0
CaCl ₂ x 2H ₂ O	3 130	4 400	KJ	69.5	33.0	10.0
KH ₂ PO ₄	1 420	1 700	Na ₂ MoO ₄ x2H ₂ O	18.8	13.8	-
Ca(NO ₃) ₂ x2H ₂ O	500	-	CuSO ₄ x 5H ₂ O	1.6	1.1	13.0
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	380	-	CoCl ₂ x 6H ₂ O	1.6	1.1	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	340	-	AlCl ₃ x 6H ₂ O	-	-	50.0
KCl	70	-	NiCl ₃ x 6H ₂ O	-	-	30.0

Табела 5. Витамини и аминокиселини (mg/100 ml) во состав на медиумите по Dumas de Valux, et al., (1981)

	F (50x)	Morel (50x)
месо-инозитол	25	5 000
никотинска киселина	25	50
витамин B ₆	500	50
витамин B ₁	5	50
глицин	10	-
Са пантотенат	-	50
биотин	-	0,5

Периодот на индукција од 12 дена со температурен третман е неопходен за формирање на хаплоидни и спонтани двојно хаплоидни ембриониди од микроспорите. Тој се одвива на CP медиумот во две фази и тоа:

- првите 8 дена, антерите се инкубираат, на темно и на $+35\pm 2^{\circ}\text{C}$;
- а следните 4 дена во клима комора на $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 h светло / 12 h темно.

После 12 дена инкубација антерите беа пренесени на R₁ медиум на $+25\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 h светло / 12 h темно, каде е одредуван андрогентскиот потенцијал преку процентот антери кои формирале хаплоидни ембриониди.

R₂ медиумот се користи во случај на стопирање на развојот на ембрионидите во торпедо стадиум. Во случај кога ембрионидите потполно се бели и мазни се отстрануваат од антерата и се пасажираат на R₂ медиум, каде не смеат да се држат повеќе од една недела.

Формираните хаплоидни изданоци беа пасажирани на V₃ медиум, каде се одвиваше и ризогенезата, после која изданоците беа спремни за адаптација за надворешна средина.

3.4. Услови за одгледување на културите

Културите од антери беа поставени во петриеви садови на индуктивните медиум (поглавје 3.3), а по индукцијата беа чувани во клима комора (Слика 14) со услови:

- температура од $25 \pm 2^\circ\text{C}$;
- релативна влажност од 50%;
- фотопериодизам од 12 h светло / 12 h темно, и
- интензитет на светлина од $50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$

3.5. Квантитативно одредување на содржината на капсаицин

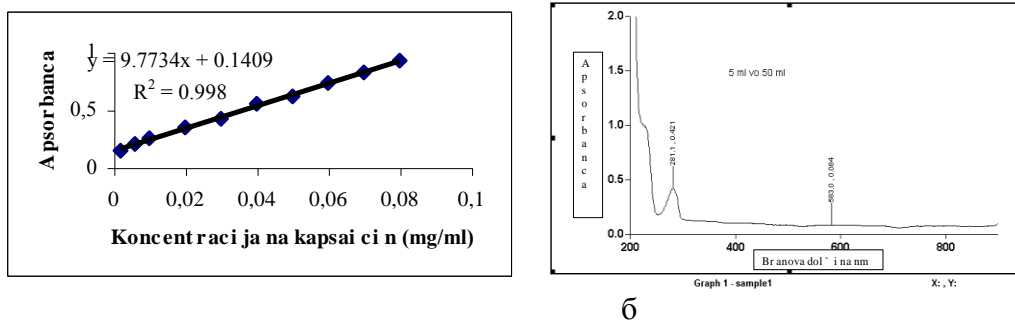
Во текот на истражувањата беше одредувана содржината на капсаицин во растителен материјал од *in vivo* и *in vitro* услови со примена на UV/VIS спектрофотометриски метод (Трејо-Gonzalez и Wild-Al-Tamirano, 1973).

Од *in vivo* услови беше земен растителен материјал од плодови на девет сорти на пиперка одгледувани во оранжериски услови и тоа: *слатко лута, лута везена, сиврија, феферона, златен медал, куртовска капија, калифорниско чудо, фехерозон и ротунд*.

Од *in vitro* услови содржината на капсаицин беше одредувана во култура на изданоци, калуси и котиледони од сортите куртовска капија и златен медал. Сите растителни примероци за анализа на содржината на капсаициноот беа исушени до воздушно сува маса (на собна температура 6-7 дена). Дополнителната влага е коригирана со сушење на пробите во термостат до константна тежина, на температура од 105°C и времетраење од 5 часа.

Екстракцијата на капсаициноот од сувиот растителниот материјал (0.1 - 0.5 g) беше изведена со 96% етанол во водена бања на температура од 40°C , за времетраење од 5 часа. Потоа, со водена вакуум филтрација е добиен етанолниот екстракт на капсаициноот, кој соодветно е разредуван за отчитување. Апсорбанцата

на вкупниот капсаицин во етанолниот екстракт беше мерена спектрофотометриски на бранова должина од 281nm (Слика 1б).



Слика 1 а). Стандардна крива за капсаицин на 281 nm

б). Апсорпционен спектар на стандардот капсаицин со карактеристичен пик на 281,1 nm

Стандардната крива (Слика 1а) беше подготвена со стандарден раствор (0.02-0.1 mg/ml) на капсаицин (Sigma, Швајцарија), а коефициентот на линеарната корелација изнесуваше $R^2=0,998$ ($y=9,7734x+0,1409$).

Вредностите за содржината на капсаицинонот во *in vivo* плодови и *in vitro* култури на пиперка, изразени се во $\mu\text{g/g}$ и процент на капсаицин во свежа маса.

3.6 Статистичка обработка на податоци

Резултатите добиени во текот на истражувањето беа статистички обработени со статистичката програма SPSS 10.0. Сите податоци кои се однесуваат на процентот на калусогенеза, процентот на ембриогенетски антери и бројот на ембриоиди на 100 антери беа предмет на анализа на варијанса (ANOVA), а средните вредности беа евалуирани кога прагот на сигнификантност е $p<0.05$ користејќи Duncan's Multiple Range Test.

4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

4.1. Резултати од истражувањата во 2004 година

Во текот на истражувачката 2004 година испитуван беше ефектот на ладниот и топлиот стрес третман на девет генотипови на пиперка. Како стартен експериментален материјал за андрогенеза на пиперка на различни медиуми и различни стрес третмани беа користени пупки од 9 генотипови на пиперка .

Семето од различните генотипови беше посеано на 20.02.2004, поникнувањето беше на 02.03.2004, а пресадувањето во саксии беше направено на 18.03.2004. Од секој генотип беа пикирани по десет растенија, саксииите беа поставени во оранжериски услови и одгледувани со соодветните заштитни мерки (Слика 6).

Табела 6. Индуција на калус (%) од антери на пиперка култивирани на различни медиуми со ладен и топол пред третман (2004).

третман и медиум						
Генотип	индуци- рани антери	MS	N	LS	NN	CP
		25°C % калус	25°C % калус	7°C % калус	7°C % калус	35°C % калус
<i>феферона</i>	398	36.49 a	58.88 a	26.24 bc	19.37c	0.00 d
<i>слатко лута</i>	428	48.90 a	34.00 b	34.40 b	17.44 c	6.80 c
<i>везена лута</i>	360	30.98 a	9.84 b	33.33 a	5.03 b	27.85 a
<i>сиврија</i>	405	11.42 a	14.42 a	18.03 a	18.25 a	14.23 a
<i>златен медал CP</i>	297	14.91 a	9.47b c	6.66 c	11.40 b	7.33 c
<i>куртовска капија CP</i>	325	14.91 a	8.04 b	15.22 a	9.33 b	8.26 b
<i>калифорниско чудо</i>	429	12.10 b	30.66 a	13.67 b	14.96 b	15.13 b
<i>ротунд</i>	331	10.06 b	9.26 b	17.35 a	9.28 b	19.00 a
<i>фехерозон</i>	301	4.94b c	4.78 bc	13.44 a	11.30 ab	3.92 c

Врз база на литературни податоци, топлиот стрес (+35°C) има поголем ефект од ладниот (+7°C) во стимулирањето на делбената активност за микроспорите, што се потврди и со резултатите од овие истражувања. Температурните стрес инкубациски третмани имаат влијание на поттикнувањето на андрогенетските процеси. Ладниот, на LS и NN медиум, и топлиот стрес третман, на CP медиум, значително го намалија калусирањето на антерите, во споредба на MS и N медиумот, каде антерите се инкубираа на + 25°C. Меѓутоа на сите овие медиуми (MS, N, LS, NN) калусирањето е водечка појава (Табела 6). Единствено на CP медиумот добиени се хаплоидни ембриоиди од пет генотипови на пиперка, а калусирањето е минимално (Табела 7, Слика 13).

Табела 7. Андрогенетски одговор на различни генотипови од пиперка инкубирани на CP медиум +35°C, во темно (2004).

Генотип	култиви- рани антери (бр)	Ембриогенетски антери (%)	Број на ембриоиди на 100 антери	Андрогене- тски одговор
<i>фехерозон</i>	130	33.66 ± 6.02 a	55.36 ± 1.00 a	Одличен
<i>калифорниско чудо</i>	151	6.16 ± 0.28 b	5.66 ± 0.57 b	Добар
<i>златен медал CP</i>	94	3.31 ± 0.24 b	3.66 ± 0.57 c	Слаб
<i>слатко лута</i>	140	2.43 ± 0.20 b	3.33 ± 0.57 c	Слаб
<i>куртовска капија CP</i>	120	1.55 ± 0.50 b	2.66 ± 0.57 c	Слаб
<i>везена лута</i>	83	0.00 c	0.00 c	Нема
<i>сиврија</i>	104	0.00 c	0.00 c	Нема
<i>ротунд</i>	109	0.00 c	0.00 c	Нема
<i>феферона</i>	79	0.00 c	0.00 c	Нема

Врз основа на добиените резултати може да се каже дека, сите испитувани сорти не се способни за формирање на хаплоидни ембриоиди (Слика 13). По индуктивниот период на CP медиум од 12 дена, антерите беа префрлувани на R₁ медиум. На овој медиум ембриоидите уште на самиот почеток покажуваат

тотипотентност, напредуваат во својот раст и развој и формираат изданок (Слика 15 и 16).

Формираниот изданок го продолжува својот развој на V₃ медиум (Слика 17), каде без присуство на фитохормони се оформуваат млади растенија на хаплоидна пиперка. Вкоренувањето настанува, исто така, на V₃ медиум, а добро вкоренетите изданоци се префрлуваат во стерилна мешавина на песок : перлит : тересет во сооднос 1 : 1 : 1 и се подготвени за адаптација и аклиматизација на нестерилни услови (Слика 18 и 19).

Анализата од содржината на капсаицинон во плодови на пиперка покажа дека лутите генотипови не формираат соматски ембриоиди во култура од антери на пиперка (Табела 7 и 8). Најверојатно инхибирачкото дејство на капсаицинон има влијание во формирањето на хаплоидните ембриоиди. Така на пример, генотиповите кои содржат повеќе капсаицин воопшто (*феферона*, *везана лута*, *сиврија*) немаат андрогенетска способност. Исклучок е со генотипот *ротунд* кој по содржина на капсаицин припаѓа во слатки видови (216.86 µg/g) а нема андрогенетски одговор во култура на антери. Механизмот на дејството на капсаицинон врз процесите кои се одвиваат во услови *in vitro* сè уште е непознат.

Табела 8. Содржина на капсаицин во плодови на пиперка *in vivo* улови

Генотип	Содржина на капсаицин во плодови на пиперка	
	µg/g во свежа маса	% во свежа маса
<i>феферона</i>	899.76±51.8 a	0.0901±0.0007 a
<i>слатко лута</i>	863.3±3.88 ab	0.0866±0.0002 ab
<i>везана лута</i>	618.65±1.9 bc	0.0615±0.0007 bc
<i>сиврија</i>	532.45±34.58 cd	0.0520±0.0337 cd
<i>златен медал</i> CP	324.27±70.14 de	0.0330±0.0084 de
<i>куртовска капија</i> CP	271.11±5.04 e	0.0272±0.0002 e
<i>калифорниско чудо</i>	234.98±10.3 e	0.0235±0.0070 e
<i>ротунд</i>	216.86±9.39 e	0.0217±0.0003 e
<i>фехерозон</i>	205.76±93.69 e	0.0205±0.0007 e

4.2. Резултати од истражувањата во 2005 година

Во текот на 2005 како стартен експериментален материјал за андрогенеза на пиперка по Dumas de Valux et al. (1981) беа користени пупки од 9 генотипови на пиперка. Семето од различните генотипови беше посеано на 22.03.2005, поникнувањето беше на 04.04.2005, а пресадувањето во саксии беше направено на 16.05.2005. Од секој генотип беа пикирани по десет растенија, саксииите беа поставени во оранжериски услови и одгледувани со соодветните агротехнички и заштитни мерки.

Одреден број на антерите од деветте различни генотипови на пиперка беа поставени на СР медиум по Dumas de Valux et al. (1981) со цел да се индуцира андрогенеза. Поставување на антери и нивен понатаношен третман беа извршени од 21.06.2005 до 28.12.2006 (Табела 9).

На 29.12.2005 ембрионите добиени со процесот на андрогенеза од *in vitro* услови беа пресеани на стерилна смеска од хумус, пелит и песок (1:1:0.25) и поставени во клима комора. На 28.04.2005 целосно регенерираните растенија беа извадени од клима комората и беа поставени во оранжериски услови. Истите на 17.05.2006 беа поставени под акрилно платно за да се избегне можното вкрстено опрашување помеѓу различните сорти.

Врз основа на добиените резултати (Табела 9) од истражувачката 2005 година на испитуваните 9 генотипови (*златен медал СР*, *куртовска капија СР*, *пиран*, *куртовска капија ВГ*, *куртовска капија ТР*, *златен медал ШТ*, *куртовска капија МК*, *бомбона* и *фехерозон*) може исто така да се каже дека, сите генотипови немаат андрогенетска способност. Иако се работи за иста сорта пример *куртовска капија*, а 4 различни генотипови кои беа вклучени во истражувањето, се покажа дека генотиповите *куртовска капија СР* и *куртовска капија ВГ* имаат андрогенетска способност и дека формираат соматски ембриониди во култура на антери а останатите 2 генотипови, *куртовска капија ТР* и *куртовска капија МК* воопшто не формираат ембриониди.

За сортата *златен медал*, испитуваните генотипови *златен медал СР* и *златен медал ШТ* имаат добар андрогентски одговор.

Табела 9. Индукција на андрогенеза кај различни сорти на пиперка на CP медиум по методот на Dumas de Valux et al. (1981) (2005).

Генотип	Број на култивирани антери	Број на појавени ембриоиди	Ембриогенетски антери (%)	Број на ембриоиди на 100 антери	Број на ембриоиди регенерирани во растенија	Ембриоиди регенерирани во растенија (%)	Андрогенетски одговор
<i>фехерозон</i>	1042	143	6.43 ab	43.30 a	12	8.39	Добар
<i>златен медал</i> ШТ	423	3	5.60 ab	27.02 a	0	0.00	Добар
<i>златен медал</i> CP	587	27	10.35 a	16.92 a	4	14.81	Добар
<i>пиран</i>	488	58	5.03 ab	34.05 a	2	3.44	Просечен
<i>куртовска капија</i> CP	420	29	3.88 b	24.18 a	3	10.34	Слаб
<i>куртовска капија</i> BG	270	12	2.90 b	50.55 a	0	0.00	Слаб
<i>куртовска капија</i> TR	236	0	0.00 c	0.00 b	0	0.00	Нема
<i>куртовска капија</i> МК	122	0	0.00 c	0.00 b	0	0.00	Нема
<i>бонбона</i>	270	0	0.00 c	0.00 b	0	0.00	Нема

На основа на овие резултати може да се констатира дека способноста за андрогенеза во услови *in vitro* е генетски детерминирано својство и затоа слични и блиски генотипови имаа различен андрогенетски потенцијал.

И во оваа истражувачка година се констатира фактот дека лутиот генотип *бонбона* не формира соматски ембриоиди, како и во претходната 2004 година каде лутите генотипови *феферона*, *везена лута* и *сиврија* не покажаа андрогенетски одговор во култура на антери.

4.3. Резултати од истражувањата во 2006 година

Во текот на 2006 како стартен експериментален материјал за индукција на андрогенеза на пиперка по Dumas de Valux et al. (1981) беа користени антери од пупки од 10 генотипови на пиперка.

Семето од различните генотипови беше посеано на 15.04.2006, поникнувањето беше на 27.04.2005, а пресадувањето во саксии беше направено на 26.05.2006. Од секој генотип беа пикирани по десет растенија, саксииите беа поставени во оранжериски услови и одгледувани со соодветни заштитни мерки.

Одреден број на антерите беа поставени на CP медиум по методот на Dumas de Valux et al. (1981) и беше следена индукцијата на андрогенеза и бројот на појавени ембриони, како и понатамошната адаптација и аклиматизација на регенерантите. На 26.12.2006 регенерираните растенија добиени со процесот на андрогенеза од *in vitro* услови беа пресеани на стерилна смеска од хумус, пелит и песок (1:1:1) и поставени во клима комора. Резултатите од експериментот се презентирани во Табела 10.

Одреден број на антерите беа поставени на MS медиум, каде беа аплицирани кинетин (0.1 mg/l) и 2,4 D (0.04 mg/l), стрес третман од 4 дена на 35°C и пасажирање на антерите повторно на MS медиум со кинетин (0.1 mg/l). Беа следени промените на антерите во однос на андрогенеза и/или калусогенеза (Табела 11).

Одреден број на антерите беа поставени на MS медиум, каде беа аплицирани кинетин (0.1 mg/l) и 2,4 D (0.04 mg/l), стрес третман од 4 дена на 35°C и пасажирање на антерите на CP медиум (Dumas de Valux et al., 1981). Беа

следени промените на антерите во однос на андрогенеза и/или калусогенеза (Табела 12).

Од сите десет испитувани генотипови во 2006 андрогенески одговор не покажаа *златен медал* СР, *пиран* и *куртовска капија* МК (Табела 10).

Андрогенезата кај пиперка е доста ограничена појава, која е проследена со многу ограничувачки фактори како:

- структурата и градбата на микроспорите;
- стадиумот во кој е микроспората т.е. култивирањето на антерите во *in vitro* услови мора да е во фазата на првата поленова митоза или непосредно пред неа;
- растенијата од кои се собираат цветните пупките, донатори на антери, да не се постари од 4 недели од првата појава на цвет;
- колекционираниите пупки да се со венечни и цветни ливчиња со еднаква должина, кога антерата на врвот почнува да се обојува светло виолетово, т.е. незрела цветна пупка;
- генетската предиспозиција за соматска ембриогенеза;
- хормоналната регулација во *in vitro* услови;
- инхибиторното дејство на секундарните метаболити, особено капсаицинонот, и многу други познати и непознати ограничувачки фактори, за кои науката нема доволно сознанија, а кои го оневозможуваат овој процес кај видови од родот *Capsicum*.

Имајќи ја во предвид гореневедената констатација, може логично да се разбере зошто генотиповите *златен медал* СР, *пиран*, и *златен медал* ШТ во 2005 и 2006 немаат исти андрогентски одговор (Табела 9 и 10).

	андрогенетски одговор	
	2005	2006
<i>златен медал</i> СР	добар	нема
<i>пиран</i>	просечен	нема
<i>златен медал</i> ШТ	добар	слаб

Условите на одгледување на растенијата донатори на цветни пупки, лабораториските услови како и многу други познати и непознати фактори влијаело да овие генотипови во 2005 и 2006 не реагираат еднакво.

Табела 10. Индукција на андрогенеза кај различни генотипови на пиперка на СР медиум по методот на Dumas de Valux et al. (1981) (2006)

Генотип	Број на култивиран и антери	Број на појавени ембриоиди	Ембрио-генетски антери (%)	Број на ембриоиди на 100 антери	Број на ембриоиди регенерирани во растенија	Ембриоиди регенерирани во растенија (%)	Андрогенетски одговор
<i>тура</i>	300	18	17.05 а	17.06 а	5	27.78	Добар
<i>фехерозон</i>	330	27	12.08 а	12.08 а	19	70.37	Добар
<i>притавит F1</i>	330	12	9.23 а	9.39 а	2	16.67	Просечен
<i>мајори</i>	330	7	5.83 а	6.73 а	0	0.00	Просечен
<i>златен медал ШТ</i>	300	1	1.67 а	1.67 а	1	100.00	Слаб
<i>доматовидна блага</i>	360	4	4.17 а	4.54 а	2	50.00	Слаб
<i>куртовска капија СР</i>	335	1	4.00 а	5.88 а	1	100.00	Слаб
<i>пиран</i>	335	0	0.00 б	0.00 б	0	0.00	Нема
<i>куртовска капија МК</i>	350	0	0.00 б	0.00 б	0	0.00	Нема
<i>златен медал СР</i>	350	0	0.00 б	0.00 б	0	0.00	Нема

Табела 11. Процент на калусирање на антери од различни сорти пиперка инкубирани и пасажирани на MS медиум

Генотип	Број на култивирани антери	% на калусогенеза
<i>златен медал</i> CP	120	11.67 c
<i>куртовска капија</i> CP	120	15.00 bc
<i>пиран</i>	120	50.00 ab
<i>куртовска капија</i> BG	120	25.00 abc
<i>златен медал</i> ШТ	120	34.33 abc
<i>фехерозон</i>	120	0.00 d
<i>притавит</i> F1	60	56.67 a
<i>доматовидна блага</i>	120	22.50 abc
<i>тура</i>	180	16.75 bc
<i>мајори</i>	100	0.00 d

Табела 12. Процент на калусирање на антери од различни сорти пиперка инкубирани на MS и пасажирани на CP медиум

Генотип	Број на култивирани антери	% на калусогенеза
<i>златен медал</i> CP	130	8.75 a
<i>куртовска капија</i> CP	60	0,00 b
<i>пиран</i>	130	3.75 a
<i>куртовска капија</i> BG	140	0,00 b
<i>златен медал</i> ШТ	140	0,00 b
<i>фехерозон</i>	130	0,00 b
<i>притавит</i> F1	190	11.97 a
<i>доматовидна блага</i>	150	0,00 b
<i>тура</i>	130	0,00 b
<i>мајори</i>	130	0,00 b

Сите унгарски генотипови продуцираа соматски ембриониди, а по успешната аклиматизација и адаптација во стаклиеник собрано е семе од унгарскиот генотип *фехерозон* и од македонските генотипови *куртовска капија* CP, *пиран* и *златен медал* CP (Табела 13).

Табела 13. Семе собрано од различни генотипови на пиперка добиени со андрогенеза *vo in vitro* услови

Генотип	Ратение / плод	Бр.на семки по плод	Дата на собирање
<i>куртовска капија</i> CP	2/8 (*) - плод 1	22	28/07/2006
<i>куртовска капија</i> CP	2/8 (*) - плод 2	7	28/07/2006
<i>куртовска капија</i> CP	2/8 (*) - плод 3	1	28/07/2006
<i>куртовска капија</i> CP	2/8 (*) - плод 4	3	28/07/2006
<i>куртовска капија</i> CP	14/8 - плод 1	92	08/08/2006
<i>куртовска капија</i> CP	14/8 - плод 1	71	12/10/2006
<i>куртовска капија</i> CP	2/8 - плод 1	62	12/10/2006
<i>куртовска капија</i> CP	2/8 - плод 1	12	12/10/2006
<i>куртовска капија</i> CP	2/8 - плод 2	12	12/10/2006
<i>златен медал</i> CP	1/7 - плод 1	80	08/08/2006
<i>златен медал</i> CP	1/7 - плод 1	100	12/10/2006
<i>златен медал</i> CP	1/7 - плод 2	103	12/10/2006
<i>златен медал</i> CP	14/7 - плод 1	7	12/10/2006
<i>Пиран</i>	14/1 - плод 1	37	28/07/2006
<i>Пиран</i>	14/1 (1) плод 1	35	08/08/2006
<i>Пиран</i>	14/1 (2) плод 1	13	08/08/2006
<i>Пиран</i>	14/1 (2) плод 2	28	08/08/2006
<i>Пиран</i>	14/1 (2) плод 3	25	08/08/2006
<i>Пиран</i>	14/1 (1) плод 1	18	12/10/2006
<i>Пиран</i>	14/1 (2) плод 1	21	12/10/2006
<i>Пиран</i>	14/1 (2) плод 2	38	12/10/2006
<i>фехерозон</i>	Раст. 7 плод 1	49	28/07/2006
<i>фехерозон</i>	Раст. 11 плод 1	18	28/07/2006
<i>фехерозон</i>	Раст. 6 плод 1	57	08/08/2006
<i>фехерозон</i>	Раст. 6 плод 2	30	08/08/2006
<i>фехерозон</i>	Раст. 11 плод 1	16	12/10/2006
<i>фехерозон</i>	Раст. 1 плод 1	22	06/11/2006
<i>фехерозон</i>	Раст. 6 плод 1	17	06/11/2006
<i>фехерозон</i>	Раст. 6 плод 2	10	06/11/2006
<i>фехерозон</i>	Раст. 6 плод 3	43	06/11/2006
<i>фехерозон</i>	Раст. 7 плод 1	71	06/11/2006
<i>фехерозон</i>	Раст. 8 плод 1	91	06/11/2006

4.4. Резиме од истражувањата 2004-2006

Врз основа на добиените резултати може да се каже дека, сите испитувани сорти не се способни за формирање на хаплоидни ембриоиди. По индуктивниот период на СР медиум од 12 дена, антерите беа префрлувани на R₁ медиум. На овој медиум ембриоидите уште на самиот почеток покажуваат тотипотентност, напредуваат во својот раст и развој и формираат изданок.

Добро формираните изданоци на V₃ медиум (без присуство на фитохормони) беа вкоренувани на истиот медиум, а потоа по измивањето на агарот од коренчињата изданоци се префрлуваат во стерилна мешавина на песок : перлит : тересет во сооднос 1 : 1 : 1 и се подготвуваа за вообичаената адаптација и аклиматизација на нестерилни услови. Адаптацијата најпрво се одвиваше во клима комора, на контролирани услови (Слика 18), а потоа и во оранжериски услови (Слика 19)

Од сите испитувани 19 генотипови на пиперка (2004-2006), 12 имаат способност за формирање на директни соматски ембриоиди.

Само лутите генотипови *феферона*, *везана лута*, *сиврија* и *бонбона*, немаат андрогенетска способност т.е. во култура на антери не формираат хаплоидни изданоци. Исклучок од оваа се генотиповите *ротунд*, *куртовска капија* TU и *куртовска капија* МК кои не спаѓаат во лутите типови, а сепак не поажаа андрогенетска способност. т.е. на формираа соматски ембриоиди во култура на антери од пиперка. (Табела 14).

Семенски материјал беше добиен само од четири генотипови и тоа: *куртовска капија* СР, *златен медал* СР, *пиран* и *фехерозон* (Табела 13 и 15, Слика 19).

Голем број на генотипови 12 или 63.15% од вкупно 19 испитувани генотипови имаат андрогенетска способност т.е. формираат соматски ембриоиди, а 4 генотипови или 21.05 % формираат семе. Ако се има во предвид дека тоа се првите испитувања на пиперка за добивања на хомозиготни линии во Р. Македонија, процентуалните резултати на добивање на хаплоидни ембриоиди и формирање на семе се повеќе од задоволителни.

Табела 14. Андро-генетски одговор на антери од различни сорти пиперка поставени на СР медиум по методот на Dumas de Valux et al. (1981) во периодот од 2004 до 2006

Генотип	Вкупен број на култивирани антери	Ембрио-генетски антери (%)	Број на ембриоиди на 100 антери	Андро-генетски одговор
<i>тура</i>	300	17.05 a	17.05 bc	Добар
<i>фехерозон</i>	1502	13.32 ab	32.60 ab	Добар
<i>притавит F1</i>	330	9.23 abc	9.39 bc	Просечен
<i>калифорниско чудо</i>	151	6.67 abc	5.67 c	Просечен
<i>златен медал СР</i>	1031	6.12 abc	8.97 bc	Просечен
<i>мајори</i>	330	5.83 abc	6.73 c	Просечен
<i>пиран</i>	823	5.03 abc	34.05 ab	Просечен
<i>златен медал ШТ</i>	723	4.29 bc	18.57 bc	Слаб
<i>доматовидна блага</i>	360	4.17 bc	4.54 c	Слаб
<i>куртовска капија ВG</i>	620	2.90 bc	50.55 a	Слаб
<i>куртовска капија СР</i>	875	2.73 bc	10.20 bc	Слаб
<i>слатко лута</i>	140	2.43 bc	3.33 c	Слаб
<i>феферона</i>	79	0.00 c	0.00 c	Нема
<i>везена лута</i>	83	0.00 c	0.00 c	Нема
<i>сиврија</i>	104	0.00 c	0.00 c	Нема
<i>ротунд</i>	109	0.00 c	0.00 c	Нема
<i>куртовска капија МК</i>	122	0.00 c	0.00 c	Нема
<i>куртовска капија ТU</i>	236	0.00 c	0.00 c	Нема
<i>бонбона</i>	270	0.00 c	0.00 c	Нема

Табела 15. Семенски материјал собран од четири генотипови на пиперка добиени во *in vitro* култура од антери

Генотип	Број на растенија	Број на семки по плод	Вкупен број на семки
<i>куртовска капија</i> СР	9	31.33	282
<i>златен медал</i> СР	4	72.50	290
<i>пиран</i>	8	26.87	215
<i>фехерозон</i>	11	38.54	424

Колекционираниот семенски материјал претставува одлична можност за вклучување на истиот во селекционите процеси на пиперката, како и база за понатамошни цитогенетски и други истражувања на молекуларно ниво. Накратко, селекционите процеси се веќе во подготвителна фаза за што ќе се бараат нови можности за интернационална соработка и продолжување на започнатите активности со комбинирање на традиционалната селекција и селекцијата на молекуларно ниво во креација на нови линии, хибриди и сорти на пиперка.

5. ЗАКЛУЧОЦИ

Според класификацијата на Mityko и Fari (1997) за андрогенетскиот потенцијал, одредуван според процентот на антери кои формираат ембриоиди, пиперките се делат на следните типови:

- со слаб андрогенетски потенцијал - до 5% ембриогенетски антери;
- со просечен потенцијал - 5-15% ембриогенетски антери;
- со добар потенцијал- 15 - 30% ембриогенетски антери и
- со одличен андрогенетски потенцијал - над 30% ембриогенетски антери.

Резултатите од овие истражувања покажаа дека соматски ембриоиди се формираа на СР медиум со топол температурен стрес (+35°C), што е во согласност со истражувањата на De Valux et al. (1981). Од сите 17 испитувани генотипови, 12 покажаа способност за формирање на ембриоиди, и тоа:

- 2 генотипови со добар андрогенетски потенцијал:

фехерозон и *тура*;

- 5 генотипови со просечен андрогенетски потенцијал:

притавит F1, *златен медал CP*, *калифорниско чудо*, *мајори* и *пиран*;

- 5 генотипови со слаб андрогенетски потенцијал:

доматовидна блага, *златен медал ШТ*, *куртовска капија CP*, *куртовска капија BG* и *слатко лута*;

- 7 генотипови немаат андрогенетски потенцијал:

феферона, *ротунд*, *везена лута*, *бонбона*, *сиврија*, *куртовска капија TU* и *куртовска капија МК*.

Анализата на содржината на капсаицинол, во плодови на пиперка, собрани од оранжериски услови, (*in vivo*) покажа дека постои извесна негативна корелација помеѓу содржината на капсаицинол во плодовите на пиперката и андрогенетскиот потенцијал во услови *in vitro*.

Андрогенезата на пиперката е доста лимитирачки процес кој е проследен со многу инхибирачки фактори како: генотипот; структурата и стадиумот на микроспорите т.е. микроспорите се погодни за индукција на андрогенеза во фазата на првата поленова митоза или непосредно пред неа; генетската предиспозиција за соматската ембриогенеза; хормоналната регулација во *in vitro* услови; условите на раст, како и многу други фактори. Науката сè уште нема доволно објаснувања за сите познати и непознати ограничувачки фактори за овој процес кај видовите од родот *Capsicum*. Инхибиторното влијание на секундарните метаболити, особено капсаицинол, воопшто не е истражувано, иако во литературата постојат податоци дека некои бабурести и слатки генотипови имаат поголем андрогенетски потенцијал од лутите генотипови на пиперката.

Резултатите од овие истражувања, изведени на деветнаесет различни по лутина сорти пиперка, покажуваат дека андрогенетскиот потенцијал во култура од антери на пиперка е зависен од содржината на капсаицин во плодовите на пиперката. Најверојатно генетската предиспозиција за синтеза на секундарни метаболити, особено капсаицин, покрај сите други фактори, исто така има инхибиторен ефект врз соматската ембриогенеза на пиперката.

Економскиот и комерцијалниот ефект од реализацијата на проектот би бил огромен во случај ако добиените хомозиготни линии т.е. добиениот семенски материјал биде предмет на вклучување во понатамошната селекција на пиперката. Со тоа, се отвара поле за нови истражувања каде конвенционалните методи би биле поткрепени со софистицираните методи за испитување на хомозиготноста и полиморфизмот на пиперката на молекуларно ниво. Во тој поглед спаѓаат и цитогенетските испитувања (кои се во тек) за одредување на степенот на плоидноста на добиениот материјал. Апликативаната наука, во тој случај, ќе резултира со огромен комерцијален и економски ефект.

Накратко, селекционите процеси се веќе во подготвителна фаза за што ќе се бараат нови можности за интернационална соработка и продолжување на започнатите активности со комбинирање на традиционалната селекција и селекцијата на молекуларно ниво во креација на нови линии, хибриди и сорти на пиперка.

6. ПУБЛИКАЦИИ КОИ ПРОИЗЛЕГУВААТ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО

6 а) Оригинални научни трудови објавени во списанија во:

земјата:

7 рецензирани трудови

1. Колева-Гудева, Л. и Спасеноски, М. (2006): Органогенеза на котиледони од пиперка (*Capsicum annuum* L.) во услови *in vitro*. Годишен Зборник на ЈНУ Земјоделски Институт - Скопје Вол. XXIV/XXV: 81-89.

2. Колева-Гудева, Л. (2005): Капсаицин - можен инхибирачки фактор во андрогенезата на пиперката. Годишен зборник на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури 2004/2005. Вол. 4/5:67-74.

3. Колева-Гудева Л., Спасеноски, М. и Рафајловска, В. (2005): Соджина на фотосинтетски пигменти во култури од пиперка *in vitro*. Годишен зборник на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури 2004/2005. Вол. 4/5: 75-83.

4. Rafajlovska, V., Slaveska-Raicki, R., Koleva-Gudeva, L., Mitrev, S. and Srbinska, M. (2005): Chemical constituents of pungent spicy paprika (*Capsicum annuum* L.) from macedonian origin. Годишен зборник на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури 2004/2005. Вол. 4/5: 57-66.

5. Колева-Гудева, Л. и Трајкова, Ф. (2005): Добивање на семе од пиперка добиена во *in vitro* култура од антери. Годишен зборник на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури 2004/2005. Вол. 4/5: 85-93.

6. Колева-Гудева, Л. (2003): Влијание на инкубацискиот третман врз андрогенезата на пиперка (*Capsicum annuum* L.). Годишен зборник на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури 2003. Вол. 3: 87-94. (Издадено во печат 2004)

7. Колева-Гудева, Л. (2003): Култура на антери од пиперка (*Capsicum annuum* L.) Годишен зборник на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури 2003. Вол. 3: 95-102. (Издадено во печат 2004)

странство: 1 (IF 0,6 SciHort 2007.111(2):114-117)

1. Koleva-Gudeva, L., Spasenoski, M. and Trajkova F. (2007): Somatic embryogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation treatments and different media. *Scientia Horticulturae*, 111(2): 114-119

12 б) Монографски публикации во:

земјата: во подготовка

странство: нема

12 в) Трудови презентирани на научни собири во:

земјата: 4 презентации

1. Rafajlovska, V., Srbinska, M., Koleva-Gudeva, L. and Slavevska-Raicki, R. (2006): Extraction of capsaicin and carotenoides from hot red pepper (*Capsicum annuum* L.). 5th ICOSECS, International Conference of the South-Eas European Countries of Chemical Sciences at the European Crossroads, Ohrid 10-14.09.2006, Book of Abstracts, Vol 1: 141-141.

2. Koleva-Gudeva, L., Spasov, D., Rafajlovska V. (2005): Capsaicin – possibility of utalization as a biopesticide, Ist Congres of Plant Protection “Enviromental Concern and Food Safety”, Ohrid 28.XI-2.XII. 2005. pp.223-227.

3. Колева-Гудева, Л. и Спасеноски, М (2005): Соматска ембриогенеза во култура од антери на пипека. Прв Конгрес за заштита на растенијата „Заштита на животната средина и безбедност на храна,, Охрид 2811- 02.12 2005. Зборник на трудови 269-273.

4. Колева-Гудева, Л., Рафajловска, В., Спасеноски, М. (2004): Продукција на капсаицин во култури од пиперка (*Capsicum annuum* L.) во услови *in vitro*, XVIII Конгрес на хемичарите и технолозите на Македонија, 23-25.09.2004 Охрид, Македонија. Изводи од соопштенија: 380-381

странство:

2 презентации

1. Koleva-Gudeva, L., Spasenoski, M., Rafajlovska, V. (2004): *In vivo* and *in vitro* content of capsaicin in pepper (*Capsicum annuum* L.), VIII Symposium Biotechnology and Agroindustry, Velika Plana, Serbia and Montenegro 1-3. 11. 2004. Proceedings: 252-259.

2. Klopceska, J., Rafajlovska, V., Slaveska-Raicki, R., Koleva-Gudeva, L. (2006): Oleorasin extraction from spice paprika, International Symposium on Organic Chemistry, Sofia, Bulgaria, Dec.9-12, 2006. Book of abstracts 67-67.

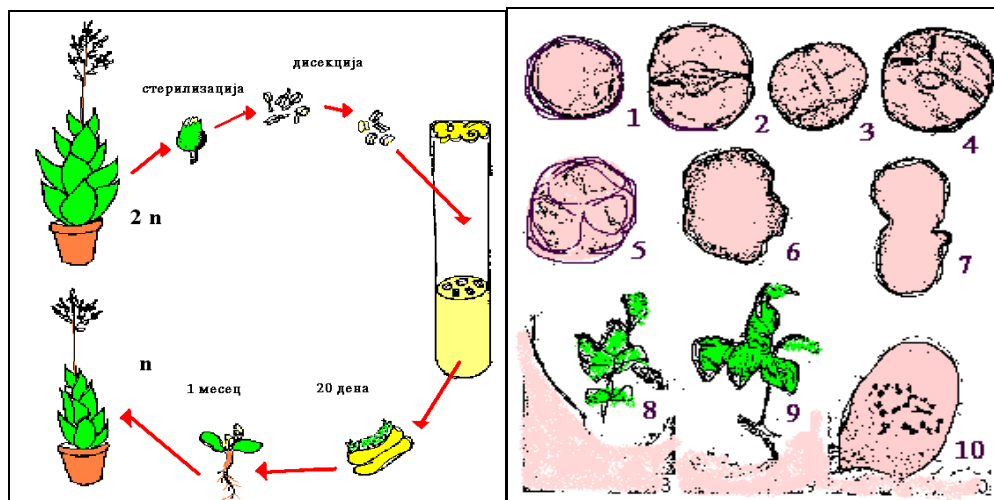
7. КОРИСТЕНА ЛИТЕРАТУРА

- Ashok Kumar, H.G., Murthy, H.N., Paek, K.Y. (2003): Embryogenesis and plant regeneration from anther cultures of *Cucumis sativus* L. *Scientia Horticulturae* 98, 213–222.
- Buyukalaca, S., Mavituna, F. (1996): Somatic embryogenesis and plant regeneration of pepper in liquid media. *Plant Cell, Organe and Tissue Culture* 46:227-235.
- Collin H. A., Edwards S. (1998): Plant Cell Culture, *BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK*.
- Dolcet-Sanjuan R., Claveria, E., Huerta, A. (1997): Androgenesis in *Capsicum annuum* L. – Effects of Carbohydrate and Carbon Dioxide enrichment, *J. Amer. Soc. Sci.* 122(4):468-475.
- Dumas de Valux, R., Chambonnet, D., Pochard, E. (1981): *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.) Anthers: high rate plant production from different genotypes by + 35°C treatments. *Agronomie* 1(10): 859-864.
- George, E.F. (1996): Plant Propagation by tissue culture: *Dianthus* spp. and hybrids. Part 2 In Practices. Exegetics Ltd. Edington. England.
- George, L., Narayanaswamy, S., (1973): Haploid capsicum through experimental androgenesis. *Protoplasma* 78, 467–470.
- Kaparakis, G. (1999): *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.), *PhD theses - Kaparakis Georgis, Aristotle Univ. Hellas, submitted Univ. Nottingham, UK*.
- Koleva-Gudeva, L., Spasenoski, M., 2001. The effect of some cytokinines on pepper organogenesis (*Capsicum annuum* L. cv. Kurtovska kapija and Zlaten medal) cultured *in vitro*. Yearbook of the Institute of Southern Crops - Strumica, vol. 1. pp. 31–35.
- Koleva-Gudeva, L., (2003): The effect of incubation treatment on the pepper (*Capsicum annuum* L.) androgenesis. Yearbook of Institute of Southern Crops - Strumica, vol. 3. pp. 87–94.
- Колева-Гудева, Л., (2005): Капсаицин - може инхибирачки фактор во андрогенезата на пиперката. Годишен зборник на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури 2004/2005. Вол. 4/5:67-74.
- Колева-Гудева, Л., Трајкова Ф. (2005): Добивање на семе од пиперка

- добиена во *in vitro* култура од антери. Годишен зборник на ЈНУ Институт за јужни земјоделски култури 2004/2005. Вол. 4/5:85-93
- Koleva-Gudeva, L., Trajkova, F., Spasenoski, M. (2007): Somatic embriogenesis in pepper anther culture: The effect of incubation threathments and different media: *Scientia Horticulturae* 111: 114-119.
- Kuo, H.C. (1997): Reversibility of the inhibitory effect of intravesical capsaicin on the micturition reflex in rats. *J. Formos Med. Assoc.* 96 (10): 819-824.
- Linsmaer, E.M., Skoog, F. (1965): Organic growth factor requirements of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant* 18, 100–127.
- Matsubara, S., Yamamoto, M., Man Hyun, J., Murakamy, K., Man, H.J. (1998): Embryoid and callus formation from microspores by anther culture from July to November in pepper (*C. annuum* L.). *Sci. Rep. Fac. Agric. Okayama Univ.* 87, 117–122.
- Mityko, J., Szabo, L., Barnabas, B. (1999): Cholchicine induced ultrastructural changes in barley and pepper microspores. *J. Slovak Acad. Sci.* 54, 24–25.
- Mityko, J., Andrasfalvy, A., Csillery, G., Fary, M. (1995): Anther-culture in different genotypes and F1 hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Plant Breed.* 114, 78–80.
- Mityko, J., Fary, M. (1997): Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther and microscope culture. *Hort. Biotech. In Vitro Cult. Breeding Acta Hort.* 447, 281– 287.
- Munyon, I.P., Hubstenberger, J.F., Phillips, G.C. (1989): Oring of plantlets and callus obtained from chili pepper anther cultures. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*25P, 293–296.
- Murashige, T., Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15, 473–497.
- Nitch, J.P. (1969): Experimental androgenesis in *Nicotiana*. *Phytomorphology* 19, 389–404.
- Nitch, J.P., Nitch, C. (1969) Haploid plants from pollen grains. *Science* 163, 85-87.
- Pierik R.L.M. (1998): *In vitro* Culture of Higher Plants, *Department of Horticulture, Wageningen Agricultural University, The Netherland.*
- Okum, C, .D., Tripirdamaz, R. (2002) The effects of cold treatment and charcoalon

- in vitro androgenesis of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Turk. J. Bot.* 26,131–139.
- Rodeva, V.N., Irikova, T.P., Todorova, V.J. (2004): Anther culture of pepper (*Capsicum annuum* L.): comparative study of effects of the genotype. *Biotechnol. Biotech. Eq.* 18/3, 34–38.
- Sangwan, R.S., Sangwan-Norreel, B.S. (1990): Anther and pollen culture. In: Bhojwani, S.S. (Ed.), *Plant Tissue Culture: Application and Limitation. Development in Crop Science*, vol. 19. Elsevier, Amsterdam, pp. 220–241.
- Trejo-Gonzalez, A., Wild-Al-Tamirano C., (1973): A New method for determination of Capsaicin in Capsicum Fruits, *J.of Food and Science*, Vol. 38: 342-344.
- Wang, T.L., Cumin A. (1996): Embriogenesis the generation of the plant, *Inst. of Enviromental and Biological Science, Div. of Biological Science, Univ. of Lancaster, UK.*

ПРИЛОГ- Фотографии од истражувањето



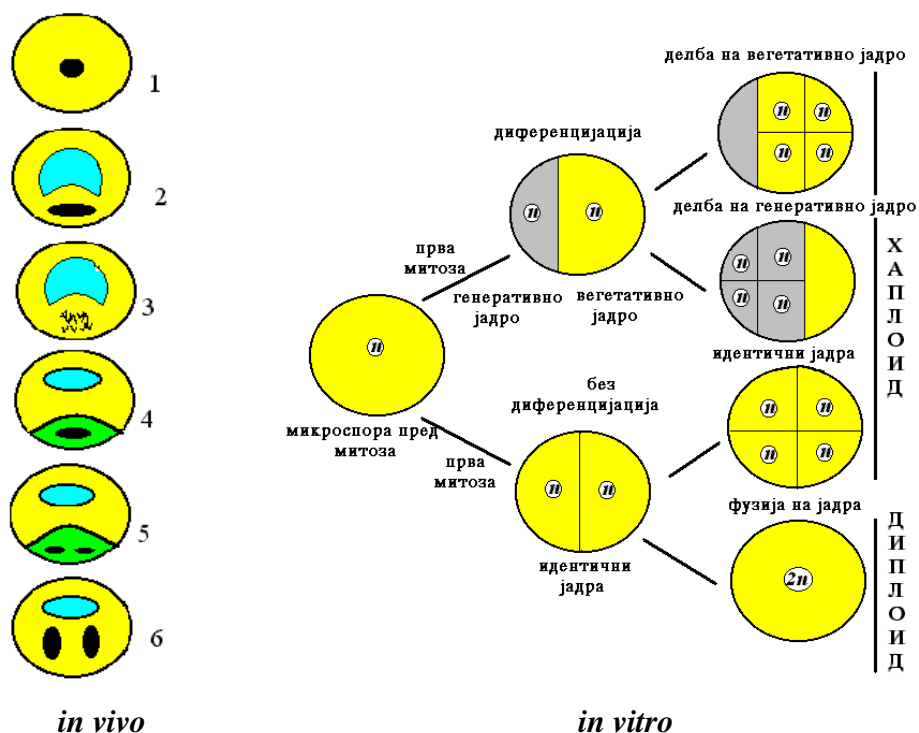
Слика 2

Слика 3

Слика 2. Техника на култура на антери (Bhojwani, 1990)

Слика 3. Добивање на хаплоиден *Capsicum* преку андрогенеза (George и Narayanaswamy, 1973)

1. Нормално поленово зрно;
2. Поленово зрно поделено на два еднакви делови;
3. Поленово зрно во кое има дегенерација на генеративната клетка (оплодената клетка), и поделба на вегетативната клетка;
4. Попречна поделба на двојадрено поленово зрно;
5. Мултицелуларно поленово зрно;
6. Диференцијација на ембрионид;
7. Ембриониди близнаци;
8. Појава на два млади изданоци;
9. Добро развиен изданок од поленово зрно;
10. Препарат од корен на хаплоидна клетка на *Capsicum* ($2n=12$).



Слика 4. Развој на микроспори во услови *in vivo* и *in vitro* (Pierik, 1998)

а) Развој на микроспора во услови *in vivo* (Sunderland, 1974).

1. Млада микроспора, вакуола неразвиена.
2. Средно-касна фаза од развојот на микроспората, вакуола присутна.
3. Нормално поларизирана прва поленова митоза.
4. Младо двоклеточно поленово зрно. Генеративното јадро е кон ѕидот. Вакуолата е редуцирана.
5. Втора поленова митоза. Вакуола многу редуцирана.
6. Зрело поленово зрно. Нема вакуола. Две сперми и едно генеративно јадро

б) Развој на микроспора во услови *in vitro* (Sunderland и Dunwell, 1974).

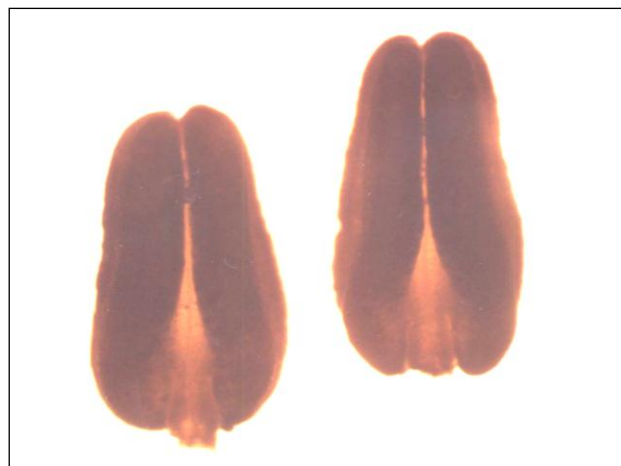
После првата митоза се јавуваат неидентични (асиметрични) или идентични (симетрични) јадра. Резултатот после втората митоза е хаплоид или диплоид (дихаплоид), а дихаплоидните клетки се јавуваат со клеточна фузија.



Слика 5. Фази од развојот на цветовите на пиперката



Слика 6. Одгледување на растенија, донатори на антери, во оранжериски услови



Слика 7. Изолирани антери од цветови на пиперка



Слика 8. Микроспори пред првата поленова митоза (x 400)



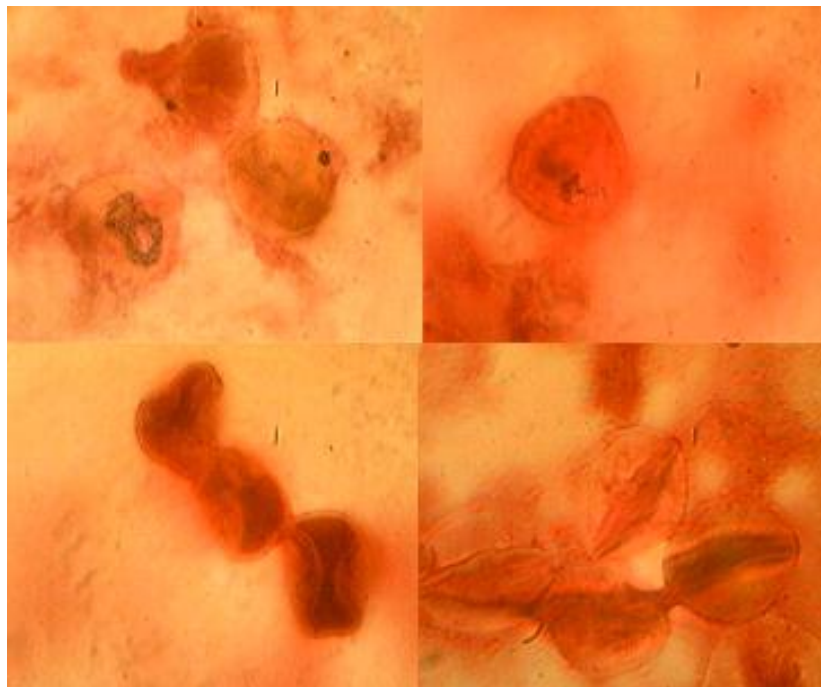
Слика 9 . Антери од пиперка на индукционен медиум (MS, LS, N и CP)



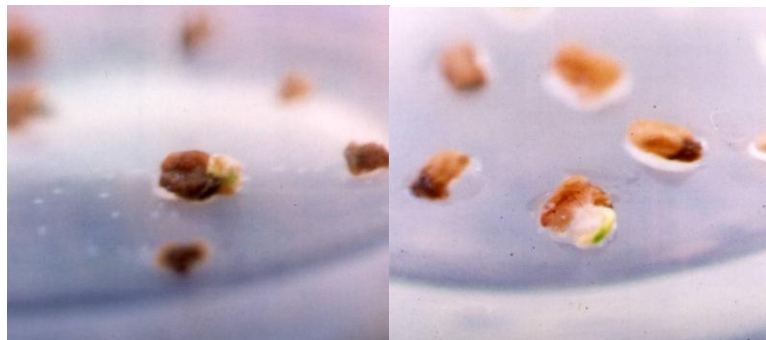
Слика 10 . Антери од пиперка на индукционен двофазен медиум (NN)

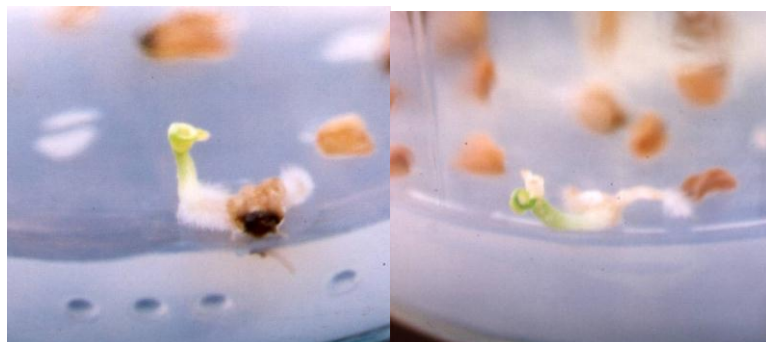


Слика 11. Делба на микроспори во услови *in vitro* (x 400)



Слика 12. Микроспори (обоени со ацето кармин) микроскопинани во разни фази на делба во *in vitro* (x 400)





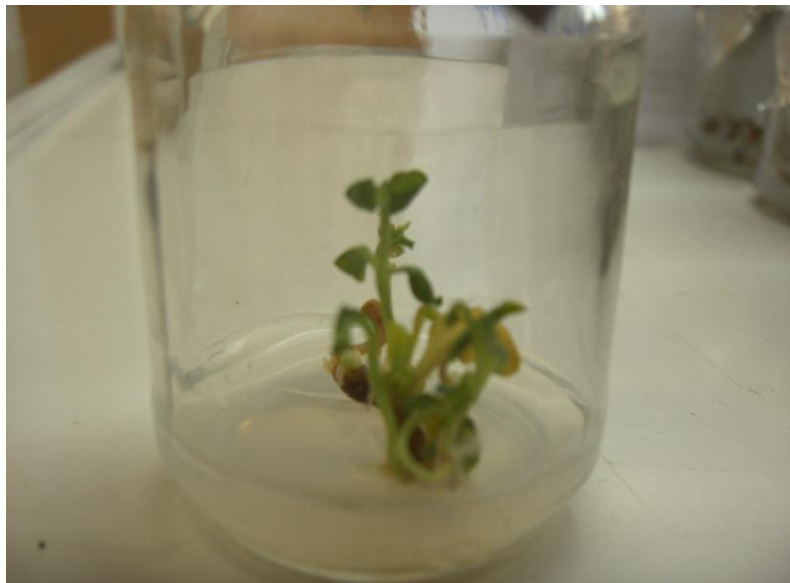
Слика 13. Појава и развој на соматски ембриоиди во култура од антери на пиперка.



Слика 14. Одржување на културите од антери на пиперка во клима комора на контролирани услови



Слика 15. Развој на ембрионите во млади регенеранти.



Слика 16. *De novo* формирање на хаплоидни изданоци R1 на медиум



Слика 17. Развој на регенеранти од пиперка на V3 медиум



Слика 18. Аклиматизација и адаптација на регенерантит во клима комора на контролирани услови



Слика 19. а-г. Целосно развиени растенија од различни генотипови на пиперка добиени со андрогенеза адаптирани и аклиматизирани во оранжерија.