



Андрогенеза и органогенеза на  
пиперка (*Capsicum annuum* L.)  
сорти Куртовска капија и Златен медал

*Capsicum annuum* L.

- АВТОРЕЗИМЕ НА ДОКТОРСКА  
ДИСЕРТАЦИЈА -

**Андрогенеза и органогенеза на  
пиперка (*Capsicum annuum* L.)  
сорти Куртовска капија и Златен медал**

**- АВТОРЕЗИМЕ НА ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА-**

**Комисија за оцена и одбрана  
на докторска дисертација**

**ментор** д-р Мирко Спасеноски, редовен професор на  
Природно-математички факултет, Скопје

**Членови на комисија:**

д-р Милто Мулев, редовен професор (во пензија) на  
Природно-математички факултет, Скопје

д-р Ленка Цветановска, вонреден професор на  
Природно-математички факултет, Скопје

д-р Данаил Јанкуловски, редовен професор на  
Земјоделски факултет - Скопје

д-р Весна Рафајловска, доцент на  
Технолошко-металуршки факултет - Скопје

**датум на одбрана: 06.04.2004**

**НАУЧНА ОБЛАСТ:** Физиологија на растенијата

## АПСТРАКТ

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. Поради богатата содржина на секундарни метаболити, особено капсаицин, привлекуваат големо внимание во научноистражувачката работа.

Цел на истражувањата во оваа докторска дисертација беше да се испита органогентскиот потенцијал, способноста за андрогенеза и формирање на хаплоидни ембриоиди, како и продукцијата на капсаицин во култури *in vitro* на пиперка (*Capsicum annuum* L.).

Изведена е успешна регенерација на сортите куртовска капија и златен медал од апикални пупки во услови *in vitro*, а испитан е и регенеративниот потенцијал на сегменти од котиледони на овие две сорти пиперка. Истражувањата за андрогенетскиот потенцијал изведени се на пет различни медиуми со три различни инкубациони третмани, при што испитувана е способноста за формирање на хаплоидни ембриоиди и калусогенеза на антерите од пиперка. Од вкупно девет различни по лутина сорти на пиперка, хаплоидни ембриоиди добиени се од пет сорти.

Содржината на капсаицин одредена е во *in vivo* плодови на девет различни по лутина сорти пиперка и во култури на изданоци, калуси и котиледони на сортите куртовска капија и златен медал во услови *in vitro*. Констатирано е дека капсаицин се синтетизира во услови *in vitro*, а испитуван е и ефектот на повеќе растителни регулатори на раст врз продукцијата на овој значаен алкалоид.

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.

Резултатите за содржината на капсаициноот во култури *in vitro* на пиперка се, исто така, први податоци кај нас за продукцијата на овој значаен алкалоид. Тоа ќе има огромен придонес за понатамошната експлоатација, апликација и примена на капсаициноот во медицината, фармацијата, биотехнологијата, растителната биохемија и физиологија како и во земјоделството.

**Клучни зборови:** пиперка (*Capsicum annuum* L.), *in vitro*, култура на растителни клетки и ткива, органогенеза, андрогенеза, содржина на капсаицин.

## ABSTRACT

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 of resistant varieties on different diseases, for creation of haploids as well as for stabilization and improvement genetic structure of the species.

The species of *Capsicum annuum* L. are most spread, largest numbered and the most varied in the shape, color and pungency of the whole plant kingdom. Due to its reach content of secondary metabolites, especially capsaicin, it attracts large interest in research science.

The purpose of this PhD thesis was to examine the organ genetic potential, the ability of androgenesis and haploid embryoides formations as well as *in vitro* production of capsaicin in the tissue culture of pepper (*Capsicum annuum* L.).

Successful regeneration of varieties of 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.

Researches for androgenetic potential were established on five different mediums with three different incubation treatments. The abilities for haploid embryoides and callus genesis from pepper anthers were examined also. From all nine different pungent varieties of pepper, five were androgenetic responsible.

The content of capsaicin was detected in *in vivo* fruits of nine different pungent varieties of pepper and in the *in vitro* cultures of shoots callus and cotyledons of Kurtovska kapija and Golden medal varieties. It is concluded that capsaicin has been synthesized in *in vitro* condition and researches about the plant growth regulators effect on its synthesis are done.

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

The results from the *in vitro* content of capsaicin are also the first published data's in the Republic of Macedonia and they have not only fundamental but also an applicative character. Further more, our researches will give large contribution for following exploitation and application of capsaicin in the medicine, pharmacy biotechnology, plant physiology and biochemistry and in the agriculture.

**Key words:** pepper, (*Capsicum annuum* L.), *in vitro*, plant tissue and cell culture, organogenesis, androgenesis, content of capsaicin.

## 1. ВОВЕД

Таксономското дрво на пиперката е следното:

**Царство:** *Plantae*

**Оддел:** *Tracheophyta*

**Класа:** *Angiospermae*

**Подкласа:** *Dicotyledones*

**Ред:** *Polemoniales*

**Фамилија:** *Solanaceae*

**Род:** *Capsicum*

Родот *Capsicum* содржи три доста сродни видови *C. annuum*, *C. chinense* и *C. frutescens* и е најраспространет денеска. *C. annuum* најпрво е препитомен во планинските висини на Мексико, и ги вклучува речиси сите мексикански лути пиперки, најголем дел од африкански и азиските пиперки, како и различни видови кои се одредуваат во земјите на умерениот појас. *C. chinense* и *C. frutescens* потекнуваат од Латинска Америка. *C. frutescens* е, исто така, култивиран во Африка и Азија како култура за зачини, за користење на цели плодови, како и за екстација на олеорезин. *C. chinense* има карактеристичен вкус и лутина, а другите два вида сè уште се преобладајќи во Латинска Америка. *Capsicum baccatum* содржи главно лути пиперки, додека во *Capsicum pubescens* влегуваат висорамнинските сорти кои се со дебел перикарп, меснати, и секогаш се користат во свежа состојба.

Сортите на *C. annuum* L. се најраспространети, најбројни и најразновидни по форма, боја и лутина во целиот растителен свет. Според своите квалитетни својства, високите хранливи вредности и вкусот пиперката спаѓа меѓу најраширените и најценетите видови во градинарството. Плодот е богат со безазотни материи (глукоза, фруктоза, сахароза и мала количина скроб), а содржи многу малку протеини и масти. Содржи многу витамин С во стабилна форма, за 4-5 пати повеќе отколку во лимонот, а по содржината на витаминот С ги надминува сите други градинарски култури. Богата е и со каротеноиди.

Лутиот вкус на пиперката доаѓа од количината на капсаицинот - отровен алкалоид, кој се движи од 0,077 - 0,834%, а кај некои сорти достигнува и до 1,90%. (Алаџајков, 1966). Според Лазик (1995), содржината на капсаицин во зачинска пиперка е околу 0,025%, а во лута околу 0,25%, но неговото присуство се чувствува и со разблажување од 1 : 200 000.

Од сите видови на родот *Capsicum* само пет се припитомени во тропските делови на Америка, а светските трендови за производство на пиперка се сконцентрирани на создавање слатки сорти од видовите на *Capsicum annuum* L.

Генетското подобрување на пиперката, пак, оди во правец на создавање на сорти кои се отпорни на најчестите и најопасни заболувања како што се:

- габи: *Phytophthora capsici* и *Rhizoctonia solani*;

- бактерии: *Xantomonas campestris*;
- нематоди;
- вируси: компиров у вирус (potyvirus), мозаичен вирус на краставицата (CMV), мозаичен вирус на тутунот (TMV) и вирус на бронзената некроза кај доматиите (TSWV);
- трипс: *Frankliniella occidentalis* вектор за (TSWV).

Успесите на полето за генетското подобрување на пиперката се зависни од достигнувањата на методите за култура на ткива и клетки во услови *in vitro*. И покрај тоа што напредокот во оваа област е значаен и евидентен за некои растенија, сепак за диференцијацијата на клеточните и ткивните култури кај пиперката се уште малку се знае.

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. 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.

На принцип на методот од Dumas de Valux, авторите Mityko и Fary (1997), како и Dolcet-Sanjuan и сор. (1997) добиле хаплоидна пиперка од неколку различни сорти.

Во поново време научните истражувања се насочени кон испитување на продукцијата на некои секундарни метаболити кај видови од родот *Capsicum*. Во овој поглед, примената на методот на *in vitro* култури на растителни клетки и ткива е насочен во правец на зголемување на биосинтезата на секундарните метаболити во услови *in vitro*.

Денес, несомнено е дека секоја супстанца од растително потекло може да се произведе со култура на клетки. Всушност, поголем број на соединенија, како што се алкалоиди, флавоноиди, терпени, стероиди, гликозиди и.т.н., т.е. неколку илјади хемиски сложени структури добиени се во култура на клетки (Sasson, 1991).

Од сите групи на секундарни метаболити, од биолошко активни компоненти на видот *C. annuum* L., водечко место имаат алкалоидите капсаициноиди. Тоа се прости фенолни амиди, се среќаваат исклучиво во претставници на родот *Capsicum*, и го даваат лутиот вкус на пиперката (Govindaraj, 1986).

Капсаициноидите претставуваат комплекс од сродни компоненти, деривати на бензиламинот, а главните пет претставници се:

- **капсаицин** - (69% застапеност во групата на капсаициноиди);
- **дихидрокапсаицин** - (22% застапеност во групата на капсаициноиди);
- **нордихидрокапсаицин** - (7% застапеност во групата на капсаициноиди);
- **хомокапсаицин** - (1% застапеност во групата на капсаициноиди);
- **хомохидрокапсаицин** - (1% застапеност во групата на капсаициноиди).

Капсаициноидот, N-(4-хидрокси-3-метоксибензил)-8-метилнон-транс-6-анамид, е силен и стабилен кристален алкалоид, кој останува непроменет на ладно или топло, поради тоа ја задржува оригиналната

јачина по долг временски период при загревање или замрзнување (слика 3 и 4). Точната содржина на капсаицин во плодови на *Capsicum* тешко може да се одреди, бидејќи нема вкус, боја и мирис, а неговото прецизно одредување е возможно само со лабораториската постапка т.н. високо ефикасна течна хроматографија. Меѓутоа, иако е без боја, вкус и мирис, капсаицилот е едно од најлутите познати соединенија, а според податоците на De Witt (1999), човековото непце го забележува и во разредување од 1 : 17 000 000.

## 2. ПРЕГЛЕД НА ЛИТЕРАТУРАТА

Досегашните работи на полето на култура на растителни клетки и ткива во услови *in vitro*, како нов биотехнички метод во нашата држава, се ограничени. Така на пример, во Република Македонија на проблематиката за култура на пиперка во услови *in vitro* кај сортата куртовска капија, од котиледони, хипокотили и апикални пупки, имаат работено само Колева и Спасеноски (1995, 1996, 2001).

Што се однесува до андрогенезата на пиперка, во нашата држава досега не се познати истражувања од ваков тип, а токму тоа беше и предизвик за работа на оваа проблематика. Соматската ембриогенеза, според Street i Withers, (1974), се дефинира како развоен процес во кој се создава идеален ембрион од само една соматска (телесна) клетка, и се формира структура која покажува биполарна активност, иста, како таа во најраните фази на зиготската ембриогенеза, (Kaparakis, 1999). Една од најкарактеристичните одлики на растителната клетка е тотипотентноста, што може да се изрази и докаже со регенерација преку ембриогенеза.

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 монохплоидно растение, кое има само еден пар на хромозоми ( $x$ ), (Pierik, 1998).

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

Кај пиперката (*Capsicum annuum* L.) единствен тип на експлантати, кои формираат соматски ембриоиди се антери, незрели зиготски ембриоиди и калус добиен од незрели зиготски ембриоиди.

Најраните истражувања 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 Narayanaewamy; 1974, 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 и сор.; 1992, Park и сор.; 1993 Qin и Rotino, но добиените регенеранти главно биле мешавина од хаплоиди и диплоиди растенија

(Kaparakis, 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.

И покрај тоа што андрогенезата е возможна од многу видови на земјоделски култури и дрвја, способноста на секој вид за успешна пропација на микроспорите, често е ограничена на само еден генотип или вариетет. Всушност, причината за оваа рестриктивна појава с еуште е непозната, и за жал успешните генотипови често пати немаат комерцијално значење. 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 (Collins и Edwards, 1998).

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

- **смирување на болка:** (Košťálová, 2002; Numazaki, 2001; Ying-Yue, 2001; Bunk, 2000; Davison, 2000; Holt, 1999; Tominaga, 1998);
- **антимикробно:** (Kurita, 2002);
- **антибактериско:** (Davison, 2000);
- **антиканцерогено:** (Davison, 2000);
- **канцерогено:** (Archer, и Jones, 2002; Dasgupta и соp., 1998);
- **анестетско:** (Bernstein 1991, 1985; Cheng, 1999; De Witt, 1998);
- **аналгетско:** (Bernstein, 1991; Ying-Yue, 2001; Cheng, 1999; Holt, 1999);
- **цитостатичко, хемотераписко:** (Zhang, J., 2003; Surh, Y., 2002).
- **фармаколошки агенс:** (Wein, 2001; Kim, 2000; De Seze, 1999, 1998; Cheng, 1999; Chancellor, 1999; Petersen, 1999; Lazzeri, 1998, 1997, 1996, 1995; Cruz, 1998, 1997; Wiart, 1998; Dasgupta, 1998; De ridder, 1997; Kuo, 1997; Donnerer, 1996; Barbanti, 1993).

Во Република Македонија досега не е добиена андрогенеза со пиперка и поради тоа резултатите од овие истражувања ќе може да послужат како појдовен метод за добивање на хаплоиди, не само кај пиперката, туку и кај други култури.

За содржината на капсаициноот во *in vitro* култури, како и за влијанието на регулаторите на растот врз продукцијата на овој секундарен метаболит, литературни податоци нема исто така, а во наШтата држава оваа проблематика воопшто не е истражувана. Тоа значи дека, резултатите од оваа докторска дисертација ќе дадат посебен придонес во растителната биохемија и физиологија, но и во другите сродни гранки.

Истражувањата имаат не само фундаментално туку и апликативно значење, особено во зголемувањето и збогатувањето на генофондот на пиперката со хаплоиди.



### 3. МАТЕРИЈАЛ 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 беа користени пупки од девет сорти на пиперка и тоа: **слатко лута, лута везена, сиврија, феферона, златен медал, куртовска капија, калифорниско чудо, фехерозон и ротунд.** Сите сорти 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.

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 од 3 пупки потоа се поставуваат во петриеви садови со пречник од 5 см 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.

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

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

После 12 дена инкубација антерите беа пренесени на  $R_1$  медиум на  $+25\pm 2^\circ C$ , 12 h светло / 12 h темно, каде е одредуван андрогентскиот потенцијал преку процентот антери кои формирале хаплоидни ембриоиди.

$R_2$  медиумот се користи во случај на стопирање на развојот на ембрионите во торпедо стадиум. Во случај кога ембрионите потполно се бели и мазни се отстрануваат од антерата и се пасажираат на  $R_2$  медиум, каде не смеат да се држат повеќе од една недела. Формираните хаплоидни изданоци беа пасажирани на  $V_3$  медиум, каде се одвиваше и ризогенезата, после која изданоците беа спремни за адаптација за надворешна средина.

Како индуктивни медиуми за андрогенеза покрај CP беа користени и MS (Murashige и Skoog, 1962) опишан погоре во поглавје 3.4, LS (Linsmaer и Skoog, 1965) медиум, N (Nitch, 1969), NN (Nitch, и Nitch, 1969) како двофазен медиум со носач. Носачите, во вид на буквата M, (слика 16 б), 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, 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, 1997) на NN и LS медиуми.

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,

### 3.2 Стерилизација на семето и изолирање на почетни експлантати

Семето од пиперка сорти **куртовска капија** и **златен медал** беше стерилизирано на следниот начин:

- најпрво семето се проплакнува во дестилирана вода и се оставаше да имбибира 2-3 часа; потоа површински се стерилиза 15 секунди во 70%  $C_2H_5OH$ ; 10 минути во 1%  $NaClO$ ; а на крај се проплакнува неколку пати во стерилна вода.

Вака стерилизираното семе беше поставено на 1/2 MS (Murashige и Skoog, 1962) минерален раствор на 'ртење. Кога младите изданоци достигнуваа големина од 3-5 cm (по 21-25 дена), од нив беа изолирани почетните експлантати и истите беа поставени на MS медиум.

За одредување на степенот на органогенеза на пиперка како почетни експлантати беа користени:

- апикални пупки со големина 1-3 mm,

- 1/3 дел од котиледони со големина 3-5 mm.

### 3.3 Постапка за екстракција и 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 (Trejo-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 капсаицинот беа исушени до воздушно сува маса (на собна температура 6-7 дена). Дополнителната влага е корегирана 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 вакум 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 281 nm.

## 4. РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

### 4.1 Андрогенеза на пиперка

Една од главните цели на оваа докторска дисертација беше да се испита способноста за андрогенеза на сортите **куртовска капија** и **златен медал**. Во текот на истражувањата е констатиран минимален т.е. многу слаб андрогенетски потенцијал на овие две сорти, и како резултат на тоа истражувањата се проширени на девет различни сорти на пиперка и тоа: **феферона** (лута сорта), **лута везена** (лута сорта), **слатко лута** (лута сорта), **сиврија** (слатка сорта), **златен медал** (слатка сорта), **куртовска капија** (слатка сорта), **калифорниско чудо** (бабуреста слатка сорта), **фехерозон** (бабуреста слатка сорта) и **ротунд** (доматовидна слатка сорта).

Испитувањата беа изведени на пет различни индуктивни медиуми и тоа: **MS** (Murashige и Skoog, 1962), **N** (Nitch, 1969), **LS** (Linsmaer и Skoog, 1965), **NN** (Nitch и Nitch, 1969) и **CP** (Dumas de Valux, 1981) медиум, со различни инкубациони третмани, за што е консултирана стручна литература од еминентни светски истражувачи на полето на андрогенезата - како најбитен фактор во соматска ембриогенеза за индукција на хаплоиди.

За зголемување на продукцијата на хаплоидни ембриоиди и на андрогенетскиот потенцијал, неопходно е да се спроведе стрес третман, односно индукционен третман, кој обично се одвива на темно со зголемена или намалена температура. Во нашите истражувања се користени следните 3 третмани и тоа:

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

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

- 8 дена антерите се инкубираатна темно и на  $+35\pm 2^\circ\text{C}$ , следните 4 дена во клима комора на  $+25\pm 2^\circ\text{C}$ , 12 h светло / 12 h темно (Dumas de Valux, 1981), а потоа на R<sub>1</sub> медиум во клима комора на  $+25\pm 2^\circ\text{C}$ , 12 h светло / 12 h темно, кој третман беше спроведен на CP медиумот.

Несомнено е дека, индукциските третмани битно влијаат врз андрогенетскиот потенцијал, со што се зголемува делбата на микроспорите во услови *in vitro*. Во нашите истражувања различните

стрес третмани исто така различно влијае врз индукцијата на калус, но индукција на хаплоидни ембриониди е добиено само на CP медиум по методот Dumas de Valux (1981) и тоа само на пет од вкупно девет испитувани сорти на пиперка (*C. annuum* L.).

#### 4.1.1 Индукција на калус од антери на пиперка

На сите испитувани медиуми

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 + 0,01 mg/l KIN + 0,01 mg/l 2,4-D

со различни стрес фактори калусирањето на антерите беше со различен степен.

Најголема индукција на калус е постигната на MS и N медиумите кога како стрес фактор беше користен инкубациски третман 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. Во тој случај, и на двата медиуми се покажа дека сите сорти имаат висок потенцијал за калусогенеза, во однос на останатите медиуми и индуктивен третмани. Исто така, забележано е дека лутите сорти калусираат со највисок процент за разлика од слатките сорти, а бабурестите сорти и домотовидната сорта покажаа најслаба калусогенеза. Но, највисок процент на калусирани антери се јави на N медиумот кај сортата феферона  $58,55\pm 11,47\%$ .

Резултатите од нашите истражувања се во согласност со резултатите на авторот Kaparakis (1999), кој на MS + 0,1 mg/l KIN + 0,01 mg/l 2,4-D, поставил култура на антери на повеќе различни сорти на пиперка (*C. annuum* L.), а добил исклучиво индукција на калус со највисока вредност од 47%.

Добиените резултати, од испитуваната корелација на процентот на калусирани антери со содржината на капсаицинот ( $\mu\text{g/g}$  свежа маса) во *in vivo* плодови на сите испитувани сорти, ја потврдија констатацијата дека содржината на капсаицинот влијае во индукцијата на калус. Релативно висока позитивна статистичка корелација постои и на двата медиуми, MS ( $r=0,7501$ ,  $p<0,05^{**}$ ); N ( $r=0,5633$ ,  $p<0,05^{**}$ ), и врз база на тоа може да се констатира дека, сортите со помала содржина на капсаицин помалку калусираат.

На LS медиумот, со примена на инкубациски третман 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, калусогенезата, исто така, и овде е присутна. Се забележува намалено калусирање, за разлика од претходните два медиуми (MS и N), меѓутоа и во овој случај кај лутите сорти калусирањето е поголемо во споредба со благите, бабурестите и домотовидната сорта. Pearson-овиот коефициент ( $r$ ) на зависност на процентот на калусирани антери со содржината на капсаицинот во плодите на пиперката покажува исто така висока статистички позитивна вредност (LS,  $r=0,6724$ ,  $p<0,05^{**}$ ).

Антерите на двофазниот NN медиум, но во присуство на малтоза, наместо сахароза, и со инкубациски третман 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,

имаат намалена способност за калусирање. Вакви услови за испитување на андрогенетскиот потенцијал кај различни сорти на пиперка има предложено во Dolcet-Sanjuan (1997), со единствена цел, за зголемување на продукцијата на хаплоидните регенеранти. Стимулативниот ефект на малтозата се уште не е познат, но се знае дека микроспорите се поосетливи на глукоза и фруктоза. Малтозата се конвертира до глукоза многу побавно од другите шеќери, со тоа се избегнува инхибиторниот ефект кој го имаат другите шеќери врз делбата на микроспорите (Dolcet-Sanjuan, 1997).

Ваквиот третман во нашите истражувања има значително влијание во намалувањето на калусогенезата на лутите сорти, а го зголемува создавањето на калус кај слатките сорти. Тоа дозволува да се коментира дека, сепак постои некоја поголема делбена активност на микроспорите, но недоволно голема за индукција на ембриоиди.

На CP медиумот, со индуктивен третман од 8 дена инкубација на антерите 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 (Dumas de Valux, 1981), но потоа се пасажирани на нов R<sub>1</sub> медиум, калусирањето на антерите во споредба со сите останати медиуми е најмало. Тоа е всушност и единствениот протокол по кој во овие истражувања се добиени ембриоиди. Калусирањето кај најлутата сорта феферона отсуствува. Исклучок од сите сорти е констатирано кај сортата везена лута, каде  $28,84\pm 7,85\%$  од антерите формираат калус. Тоа значи дека, и во овој случај забележана е истата појава како и кај NN двофазниот медиум т.е. процентот на калусирање кај лутите сорти се намалува додека кај слатките се зголемува во однос на MS, N и LS медиумите.

Согледувајќи ги резултатите од сите испитувани медиуми и за сите стрес третмани, слободно може да се резимира, дека инкубациски третман на топло и ладно има значително влијание врз калусогенезата на антерите од сите испитувани сорти на пиперка.

Механизмот на топлиот и ладниот температурен шок во индукцијата на андрогенезата е истражуван и дискутиран од голем број на автори (Dolcet-Sanjuan, 1997; Dumas de Valux, 1981; Matsubara, 1992; Munyon, 1989), но до денес, во потполност се уште не е разјаснет. Врз база на литературни податоци, топлиот стрес ( $+35^\circ\text{C}$ ) има поголем ефект од ладниот во стимулирањето на делбената активност за микроспорите, што се потврди и со резултатите од нашите истражувања.

#### 4.1.2 Индукција на хаплоидни ембриоиди од антери на пиперка

Пиперките се непредвидливи култури во услови *in vitro*, и поради тоа резултатите кои се добиваат со култура на клетки и ткива се умерени, а култура на антери по се изгледа дека е единствен исклучок од ова правило (Mityko i Fari, 1997).

Познато е дека сите видови на *C. annuum* L. не се способни за андрогенеза и формирање на хаплоидни ембриоиди. Меѓутоа, андрогенетскиот потенцијал на *C. chinese* x *C. annuum* хибридите, лутите пиперки и многу други слатки и лути пиперки е спорадичен. Според истражувањата на Mityko i Fari, (1997), степенот за андрогенеза, на

видовите кои се ембриогенетски способни, се движи некаде од 0,5 до 75 ембриоиди на 100 култивирани антери. Ограничувачките фактори и нискиот степен за андрогенеза ја намалуваат можноста за користење на култура на антери од пиперка (Dolcet-Sanjuan, 1997).

Микроспорите се индивидуални, тотипотентни клетки, тие може да бидат одлична цел за генетски трансформации. Mityko и Fari (1997), констатираат дека една од причините за многу нискиот степен на делба на микроспорите од пиперката, е тоа што истите се покриени со густ и полн ексински ѕид, што ја отежнува делбата во услови *in vitro*.

Според класификацијата на Mityko и Fari (1997), за андрогенетскиот потенцијал одредуван според процентот на антери кои формираат ембриоиди различните видови на пиперка се делат на:

- под 5% - со слаб андрогенетски потенцијал;
- 5-10 % - со просечен андрогенетски потенцијал;
- 15 - 30 % - со добар андрогенетски потенцијал;
- над 30% - со одличен андрогенетски потенцијал.

Резултатите од нашите истражувања покажаа дека хаплоидни ембриоиди се формираа само на CP медиум со топол температурен стрес (+35°C), што е во согласност со истражувањата на Dumas de Valux (1981). Според резултатите од нашите истражувања, од сите девет испитувани сорти, пет покажаа способност за формирање на ембриоиди и тоа:

- слатко лута - (2,43±0,20%) со слаб андрогенетски потенцијал,
- златен медал - (3,31±0,24%) со слаб андрогенетски потенцијал,
- куртовска капија - (1,55±0,50) со слаб андрогенетски потенцијал,
- калифорниско чудо - (6,16±0,28%) со просечен андрогенетски потенцијал, и
- фехерозон - (33,66±6,02%) со одличен андрогенетски потенцијал.

Во споредба со резултатите на авторите Mityko и Fari (1997), каде кај сортата калифорниски чудо 14,6% од антерите формирале ембриоиди, а кај сортата фехерозон 48,3 % од антерите се ембриогенетски продуктивни, во нашите истражувања овие проценти се нешто помали. Така на пример, во нашите истражувања, за сортата калифорниско чудо добиени се 6,16±0,28% андрогенетски способни антери а за сортата фехерозон 33,66±6,02%. Но, според класификацијата на гореспоменатите автори, како во нивните така и во нашите испитувања добиени се идентични резултати, односно, сортата калифорниско чудо е со просечен, а сортата фехерозон е со одличен андрогенетски потенцијал.

Од 500 различни испитувани сорти, вариетети и F<sub>1</sub> хибриди на пиперка (*C. annuum* L.), авторите Mityko и Fari (1997), констатираат дека бабурестите сорти имаат највисока андрогенетска способност, додека останатите покажуваат многу мала, или, пак, воопшто не покажуваат андрогенетска активност. Ова е потврдено и со резултатите од нашите истражувања, бабурестите сорти се ембриогенетски поспособни од лутите и слатките сорти, што е во согласност и со констатациите на светските еминентни истражувачи. Најлутата сорта феферона на CP медиум воопшто не реагира, антерите ниту калусираат ниту, пак, формираат хаплоидни ембриоиди, додека антерите од сортата

фехерозон на истиот медиум слабо калусира со  $3,92 \pm 1,38\%$ , меѓутоа покажа најголема андрогенетска способност ( $33,66 \pm 6,02\%$ ).

Најверојатно инхибирачкото дејство на капсаициномот има влијание во формирањето на хаплоидните ембриоиди. Така на пример, сортите кои содржат повеќе капсаицин воопшто немаат андрогенетска способност. Механизмот на дејството на капсаициномот врз процесите кои се одвиваат во услови *in vitro* се уште е непознат.

Температурните стрес инкубациски третмани имаат влијание на поттикнувањето на андрогенетските процеси, што се покажа и во нашите истражувања. 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  $+ 25^{\circ}\text{C}$ .

Битно е да се напомене дека, изборот на хормоналниот состав и концентрацијата на фитохормоните секако дека е еден од основните фактори за стимулација на формирање на хаплоидни ембриоиди. Според авторите Fujimura и Komamine (1975), комбинацијата на ауксин и цитокинин е неопходна за индукција на андрогенезата, а веднаш по формирањето на ембриогенетскака клеточна структура, улогата на ауксините драстично се менува, од неопходно стимулирачки во инхибиторна. Тоа дозволува да се посомневаме зошто, во нашите истражувања, не се појави формирање на ембриоиди на MS, N, LS и NN медиумот, и покрај поволниот ефект на инкубационите третмани. Во нашите експерименти, на гореневедените медиуми, антерите беа држени континуирано, и по завршувањето на инкубацискиот период, во присуството на ауксини. Најверојатно, присуството на ауксин во медиумите, дејствувало инхибиторно на самиот процес.

Сосема друг ефект беше постигнат кога антерите беа инкубирани на CP на  $+ 25^{\circ}\text{C}$ , а потоа префрлани на R<sub>1</sub> медиум без ауксини, во тој случај сите сорти кои имаа генетски предиспозиции за андрогенеза формираа хаплоидни ембриоиди. Постојат податоци дека, ембриоидите уште во самиот почеток на нивното формирање, ендогено синтетизираат свои сопствени ауксини, со што покажуваат и тотпотентност, а егзогеното аплицирање на истите во медиумот го инхибира нивното формирање во хаплоиден изданок.

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 капсаициномот, 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*.

## 4.2 Органогенеза на пиперка

Морфогенетскиот потенцијал за органогенеза беше испитуван во култура на апикални пупки, и во култура на котиледони, како почетни експлантати, на сортите **куртовска капија** и **златен медал**.

Искуствата од претходните истражувања покажа дека хипокотилите како почетни експлантати, и кај куртовската капија и кај златниот медал, главно калусираат, со сосема незначителен степен на продукција на лисни розети, а со тоа и можноста на нивна регенерација и органогенеза е ограничена. Од тие причини, во овие истражувања нивното користење беше исфрлено.

Сите истражувања за органогенезата на пиперка беа изведени на MS (Murashige и Skoog, 1962) медиум, кој до денес представува еден од најчесто користените медиуми за култура на клетки и ткива на пиперка, во услови *in vitro*. Во комбинирањето на хормоналниот состав на подлогата користевме различни концентрации и комбинации на фитохормони. Така на пример, беа користени цитокинини (KIN, BAP, ZEA и 2iP) во комбинација со ауксини (IAA, IBA, NAA и 2,4-D) или пак само цитокинини.

Кај сите видови на користени експлантати, потврдено од претходните сопствени испитувања, гиберелините, и тоа посебно GA<sub>3</sub>, во доста ниски концентрации значително ја зголемува калусогенезата, додека формирањето на лисни розети изостанува. Поради тоа, во комбинирањето на хормоналниот состав на подлогата не беше користена GA<sub>3</sub>, бидејќи со тоа ќе се оневозможи органогенезата на пиперка.

Во комбинирањето на хормоналниот состав на MS медиумот за испитување на степенот на органогенезата на апикалните пупки и котиледоните користени беа следните концентрации на цитокинините:

0,5 mg/l KIN;	0,5 mg/l ZEA;	0,5 mg/l BAP;	0,5 mg/l 2iP;
1,0 mg/l KIN;	1,0 mg/l ZEA;	1,0 mg/l BAP;	1,0 mg/l 2iP;
2,5 mg/l KIN;	2,5 mg/l ZEA;	2,5 mg/l BAP;	2,5 mg/l 2iP;
5,0 mg/l KIN;	5,0 mg/l ZEA;	5,0 mg/l BAP;	5,0 mg/l 2iP.

или пак цитокинини во комбинација на ауксини:

1,0 mg/l IAA + 10,0 mg/ BAP;	0,5 mg/l NAA + 1,0 mg/ BAP;
1,0 mg/l IAA + 15,0 mg/ BAP;	0,5 mg/l NAA + 2,5 mg/ BAP;
1,0 mg/l IAA + 20,0 mg/ BAP;	0,5 mg/l NAA + 5,0 mg/ BAP;
1,0 mg/l IAA + 30,0 mg/ BAP;	0,5 mg/l NAA + 10,0 mg/ BAP.

На сите наведени медиуми беше одредуван процентот на калусирани експлантати, процентот на формирање на лисни розети и процентот на евентуално вкоренување, особено, на медиумите во присуство на ауксини.



#### 4.2.1 Органогенеза на котиледони

За морфогенетскиот потенцијал и органогенезата кај котиледони од пиперка постојат голем број на литературни податоци (Gatz и Rogozinska, 1994; Fari и сор., 1993; Ochoa-Alejo, 1992; Kenij и сор., 1991; Kisaburo и сор., 1988; Phillips и Hubstenberg, 1985; Gunai и Rao, 1977). Сите цитирани автори своите истражувања ги изведувале на MS медиум, со таа разлика што некои од нив користеле цели, а некои сегменти од котиледонот.

За различниот морфогенетски потенцијал, низ целата должина на котиледонот, први реферираат полските автори Gatz и Rogozinska (1994). Тие во своите истражувања наместо цели котиледони користат 1/3 делови од котиледонот како апикални, медијални и базални сегменти.

Од нашите претходни испитувања, а тоа е во согласност и со резултатите на авторите Gatz и Rogozinska (1994), битно е да се напомене дека, кога се култивират цели котиледони се добива претежно калус. Од тие причини, во овие истражувања како почетни експлантати беа користени третински делови од котиледон K1 (апикален сегмент), K2 (медијален сегмент) и K3 (безален сегмент), со почетна големина од 3-5 mm.

##### 4.2.1.1 Влијание на некои цитокинини врз органогенезата на котиледони од пиперка

Под влијание на цитокинини органогенезата на котиледони од пиперка оди исклучиво во правец на калусогенеза и формирање на лисни розети.

За сите сегменти на котиледонот K1, K2, и K3, и на сите испитувани серии од цитокинини (0,5-5,0 mg/l), котиледоните од сортата куртовска капија реагираат на следниот начин:

<b>на серијата KIN:</b>	0,0-91,06% калус,	0,0-69,65% лисни розети;
<b>на серијата ZEA:</b>	39,83-96,06% калус,	0,0-54,33% лисни розети;
<b>на серијата BAP:</b>	20,40-84,00% калус,	0,0-85,76% лисни розети;
<b>на серијата 2iP:</b>	83,07-100,0% калус,	22,05-89,13% лисни розети;

а, кај сортата златен медал на испитуваните серии од цитокинини процентот на калусирање и формирање на лисни розети е прикажан во текстот:

<b>на серијата KIN:</b>	22,00-82,51% калус,	0,0-70,54% лисни розети;
<b>на серијата ZEA:</b>	66,07-95,16% калус,	0,0-80,15% лисни розети;
<b>на серијата BAP:</b>	63,33-100,0% калус,	0,0-83,08% лисни розети;
<b>на серијата 2iP:</b>	83,07-100,0% калус,	31,16-64,20% лисни розети.

Врз основа на добиените резултати може да се констатира дека, од сите испитувани цитокинини (KIN, BAP, ZEA и 2iP) најголемо влијание врз органогенезата на котиледони покажа фитохормонот 2iP, како кај сортата куртовска капија така, но исто така и за сортата златен медал. Најмала стимулација врз органогенетските процеси во услови *in vitro* покажа цитокининот KIN, а нешто поголема од него покажаа BAP и ZEA.

За сите испитувани серии на сите цитокинини се констатира дека различните сегменти од котиледонот имаат различен капацитет за

органогенеза. Всушност, базалните делови на котиледонот К3 имаат поголем афинитет за формирање на лисни розети за разлика од К1 апикалните делови каде калусирањето е најголемо, а формирањето на лисни розети нешто заостанува.

Резултатите од нашите истражувања се во согласност со истражувањата на Gatz и Rogozinska (1994) и Fari (1986), кои први констатираат дека морфогенетскиот потенцијал на различни делови од котиледонот е различен. Според истите автори, различниот капацитет за органогенеза се должи на различното присуство на ендогени цитокинини во котиледонот.

Истата појава е забележана и во истражувањата на Kisaburo и сор. (1988), кои како почетни експлантатаи користеле  $\frac{1}{4}$  делови од котиледонот. Нивната констатација е дека капацитетот за формирање на лисни розети се намалува од базалниот кон дисталниот дел на котиледонот и е во сигнификантна зависност со големината на котиледонскиот сегмент. Според истите автори најсоодветни за формирање на адвентивни пупки се базалните четвртини на котиледонот.

Во нашите истражувања, со зголемување на концентарцијата на сите испитувани цитокинини во MS медиумот забележана е позитивна корелација и во формирањето на лисни розети, но исто така, но и во калусирањето. Концентрациите 2,5 mg/l и 5,0 mg/l за сите испитувани цитокинини се подобри за органогенезата на котиледоните, за разлика од концентрациите 0,5 mg/l и 1,0 mg/l, на кои комбинации за цитокининот KIN и двете испитувани сорти воопшто не формираат лисни розети.

#### **4.2.1.2 Влијание на некои ауксини во комбинација со цитокинин врз органогенезата на котиледони од пиперка**

Влијанието на испитуваната серија IAA/BAP врз органогенезата на котиледони од пиперка е слично со онаа на цитокинините, при што забележано е формирање на лисни розети и калус. Потенцијалот за формирање на лисни розети е најголем во К3 сегментот, а најмал во К1, но за калусирањето е обратно, најголема е калусогенезата на К1 а најмала на К2.

Констатацијата на светските експерти за присуство на ендогени цитокинини во самиот котиледон се потврди и во овие истражувања. Со зголемување на концентрацијата на BAP (10; 15; 20 и 30 mg/l при константана концентрација на IAA 1,0 mg/l), се појавува негативна корелација и за формирањето на лисни розети и за калусирањето и на двете сорти пиперка.

Тоа без сомнение укажува на фактот, дека заради присуството на ендогени цитокинини пониските концентрации на BAP ја стимулираат органогенезата на сите делови на котиледонот повеќе во споредба со повисоките концентрации.

Во испитувањето на морфогенетскиот потенцијал на котиледоните за органогенеза, единствено на серијата NAA/BAP се има појавено ризогенеза. Имено, релативно ниски концентрации на NAA се доволни да ја стимулираат ризогенезата во сите сегменти на котиледонот. Тенденцијата на К1 деловите за поефективно калусирање и овде е

забележително, а ризогенезата е поизразена во базалните К3 за разлика од К1 дисталните делови.

Оваа констатација се поклопува со истражувањата на Gatz и Rogozinska (1994), кои наведуваат дека сегментите земени од базалниот дел на котиледонот имаат повисок капацитет за формирање на корени, за разлика од сегментите земени од апикалните делови на котиледонот.

Во нашите истражувања, и двете сорти покажуваат ист одговор на ауксините т.е. иако аплициран во повисока доза 1,0 mg/l IAA не влијае на ризогенезата на котиледоните, додека NAA во доза значително помала 0,5 mg/l стимулира формирање на коренчиња. Затоа, со право може да се резимира дека котиледоните на сортите куртовска капија и златен медал се посензитивни на ауксинот NAA од ауксинот IAA.

#### 4.2.2 Органогенеза на апикални пупки

Меистемските експлантати секогаш покажуваат повисок регенеративен капацитет во однос на било кое друго немеристемско ткиво во услови *in vitro* (Phillips и Hubstenberger, 1985). Тоа се и експлантати кои се најчесто користени во култура *in vitro*, а на пиперката имаат работено: Diaz и сор. (1988); Agrawal и сор. (1989); Fari и Czako, (1981); Sultanbawa и Phatak, (1991), Спасеноски и Колева (1994, 1996); Колева и Спасеноски, (1995); Колева-Гудева, Митрев и Спасеноски (2001); Колева-Гудева и Спасеноски (2001).

Апикални пупки од пиперка, сорта куртовска капија, за само неколку дена формираат изданок и од сите испитувани експлантати истите имаат највисока способност за регенерација во култура (Колева, 1995).

Литературните податоци, и нашите сопствени искуства, говорат дека морфогенетскиот потенцијал за органогенеза е најголем во меристемот, а ако се има во предвид структурата на меристематското ткиво и неговиот низок степен на диференцијација, не постојат сомнежи за успешно организирање на вакво ткиво во изданок.

##### 4.2.2.1 Влијание на некои цитокинини врз органогенезата на апикални пупки од пиперка

Органогенезата на апикалните пупки, од сортите куртовска капија и златен медал, под влијание на цитокинините оди исклучиво во правец на формирање на лисни розети и калусирање.

Генерално, за сите испитувани цитокинини во серија 0,5-5,0 mg/l апикалните пупки од сортата куртовска капија реагираат на цитокинините на следниот начин:

<b>на серијата KIN:</b>	34,82-91,06% калус,	31,40-69,65% лисни розети;
<b>на серијата ZEA:</b>	8,73-25,85% калус,	84,98-96,94% лисни розети;
<b>на серијата BAP:</b>	18,15-35,26% калус,	82,25-93,09% лисни розети;
<b>на серијата 2iP:</b>	52,21-75,10% калус,	50,02-98,0% лисни розети;

а, кај сортата златен медал на испитуваните серии од цитокинини процентот на калусирање и формирање на лисни розети од апикалните пупки е како што следува:

на серијата KIN:	21,78-44,36% калус,	0,0-72,45% лисни розети;
на серијата ZEA:	20,09-25,85% калус,	50,90-92,36% лисни розети;
на серијата BAP:	12,28-75,64% калус,	36,11-78,05% лисни розети;
на серијата 2iP:	50,91-77,78% калус,	77,75-97,77% лисни розети.

Не само кај котиледоните, но и кај апикалните пупки цитокининот KIN најмалку влијае на поттикнување на регенеративната способност на апикалните пупки на пиперка. На MS медиум, кинетинот аплициран во концентрација од 0,5 mg/l и 1,0 mg/l, кај сортата златен медал, го оневозможува формирањето на лисни розети. Цитокининот зеатин, има поголемо влијание врз органогенезата и кај двете испитувани сорти, поради тоа што, во споредба со кинетинот, го намалува калусирањето, а формирањето на лисни розети се зголемува. Во тој поглед уште поизразит е ефектот на BAP и за двете испитувани сорти.

Корелацијата на концентрацијата на KIN, ZEA и BAP во MS медиумот со процентот на формирани лисни розети и калусирање, воглавно, покажува позитивна вредност. Што значи дека повисоките испитувани концентрации (2,5 mg/l и 5,0 mg/l) биле со поизразит стимул врз органогенезата на апикалните пупки од пиперка.

Највисок процент на формирање на лисни розети се јавува на MS медиум во присуство на 2iP. На MS + 5,0 mg/l 2iP формирањето на лисни розети кај сортата куртовска капија е дури  $98,09 \pm 2,54\%$ , а кај сората златен медал  $73,56 \pm 3,10\%$  од поставените експлантати формирале лисни розети. Со зголемувањето на концентрацијата на 2iP во испитуваната серија се намалува и процентот на лисни розети и процентот на калусирање. Се појавува негативна корелација за сортата куртовска капија и за двата испитувани параметри а за сортата златен медал калусирањето е во негативна, но формирањето на лисни розети е во позитивна корелација со концентрацијата на цитокининот 2iP во MS медиумот.

И двете испитувани сорти најсензитивни се на цитокининот 2iP кој во релативно ниска концентрација 0,5 mg/l силно влијае на поттикнување на морфогенетскиот потенцијал за регенерација на апикалните пупки во изданок.

Нашите резултатите, од истражувањата за ефектот на цитокинините врз морфогенетскиот потенцијал и органогенезата на апикални пупки од пиперка се во согласност со истражувањата на Tomaszewska-Sowa и сор. (2002). Имено, полските автори Tomaszewska-Sowa и сор. (2002) во своите истражувања го испитувале морфогенетскиот потенцијал и способноста за формирање на адвентивни пупки на повеќе различни експлантати на пиперка и тоа на MS медиум обогатен со цитокинините BAP, 2iP, ZEA и TDZ. Авторите констатирале дека, цитокининот BAP најмногу ја зголемува регенеративната способност и формирањето на адвентивни пупки, кај сите испитувани експлантати.

#### 4.2.2.2 Влијание на некои ауксини во комбинација со цитокинин врз органогенезата на апикални пупки од пиперка

Хормоналната комбинација IAA/BAP во MS медиумот врз органогенезата на апикалните пупки на пиперка влијае со калусирање и формирање на лисни розети во доста високи проценти, и кај двете испитувани сорти. Поголеми концентрации на цитокининот BAP (10,0; 15,0; 20,0; 30,0 mg/l) при константна концентрација на IAA (1,0 mg/l) поволно влијаат на формирањето на лисни розети и изданоци од апикалните пупки на пиперка. Pearson-овиот коефициент на корелација, помеѓу концентрацијата на BAP во медиумот и процентот на формирање на лисни розети и калусирање, покажува статистички несигнификантни позитивни вредности, што укажува за користење на повисоки концентрациина BAP за организирање на лисните розети во изданоци.

Во случај кога во хормоналниот MS медиум ендогеное е аплицирано NAA/BAP, регенеративните процеси на апикалните пупки покажуваат тенденција и на ризогенеза, освен формирање на калус и лисни розети кои се основни појави во култура *in vitro*. Ауксинот NAA иако во ниска концентрација (0,5 mg/l) ја иницира ризогенезата кај апикалните пупки. Во случај кога MS медиумот е комбиниран со IAA/BAP, формирањето на корени отсуствува.

Истата констатација ја потврдиле и авторите Phillips и Hubstenberg, (1985), кои потврдиле дека пониските концентрации на BA/IAA повеќе ја стимулирале ризогенезата, за разлика од повисоките концентрации, кај сите почетни експлантати.

Согледувајќи ја регенеративната способност на сортите куртовска капија и златен медал, на сите испитувани MS медиуми (со цитокинини или ауксин/citoкинин), и врз основа на добиените резултати, може да се констатира дека сортата златен медал има поголеми регенеративни можности од сортата куртовска капија. Разликите се многу мали и незначителни, а на некои хормонални медиуми се јавуваат и отстапки од оваа правило, но, сепак сортата златен медал покажува нешто поголем морфогенетски потенцијал за органогенеза и при изолирање на апикалните пупки, но, и кај котиледоните.

#### 4.2.3 Вкоренување и адаптација на изданоци од пиперка

Ауксините се фитохормони кои ја индуцираат ризогенезата, без нивно присуство вкоренувањето отсуствува. Помалите концентрации на ауксини во MS медиумот го стимулираат вкоренувањето, а најверојатно ниските вредности на истите во медиумот ја стимулираат ендогенета биосинтеза. Доколку концентрациите на IAA и IBA се повисоки во тој случај процентот на вкоренувањето е значително помал, а се одразува и по бројот на корените по изданок и по нивната должина (Спасеноски и Колева, 1994).

И во нашите истражувања се потврдија констатациите дека ниски концентрации на ауксини се стимулирачки за ризогенезата, што е во согласност со истражувањата на Спасеноски и Колева, (1994). Тоа значи дека, од сите комбинации најголем ефект имаа најниските аплицирани доза на ауксини MS + 0,04 mg/l IAA + 0,1 mg/l IBA и MS + 0,04 mg/l IAA + 0,1 mg/l NAA. Од сите испитувани ауксини најголем ефект покажа NAA, така да на медиумот MS + 0,04 mg/l IAA + 0,1 mg/l NAA кај сортата куртовска капија вкоренувањето е застапено со дури  $91,67 \pm 0,57\%$  а кај

сортата златен медал  $96,25 \pm 5,30\%$  од изданоците се вкорениле. Меѓутоа, на овој медиум, и за двете испитувани сорти, се формираат и најголем број на корени по изданок, но и со најголема должина.

Од сите испитувани ауксини најголем ефект врз вкоренувањето на пиперката покажа NAA, кој и во многу ниски концентрации резултира со висок процент на вкоренување. Истото се констатира и за котиледоните и за апикалните пупки на двете сорти кога во медиумот е аплициран во комбинација ауксин/цитокинин.

Сортата златен медал има поголема можност за вкоренување од сортата куртовска капија во услови *in vitro*, разликата е многу мала, скоро незначителна, но сепак постои.

Добро вкоренетите изданоци се аклиматизираат на надворешната средина етапно и тоа во првата фаза во клима комора, потоа во оранжериски услови и на крај на отворено. Во тој поглед сортата куртовска капија е повеќе прилагодлива и поднесе помалку загуби во фазите на аклиматизација од сортата златен медал.

### 4.3 Содржина на капсаицин

Од неговото откривање (Thresh, 1846), па се до денес, капсаициноот, со неговото дејство и употреба, е тема на многу истражувања, во широки рамки, почнувајќи од медицината, фармацијата, технологијата, биохемијата, растителната физиологија и земјоделството. Капсаициноот е цел на испитувања од различни аспекти, па сепак се уште, патиштата на неговата биосинтеза и трансформации во целост се неразјаснети. Тоа е алкалоид со големо значење за човекот и наоѓа широка примена, почнувајќи од секојдневната исхрана, конзумиран во свежа состојба и како зачин, па се до неговата употреба како лек.

Посебно внимание во текот на овие истражувања беше посветено на содржината на капсаициноот во *in vivo* плодови на пиперка, како и во *in vitro* култури на калуси, котиледони и изданоци.

#### 4.3.1 Содржина на капсаицин во *in vivo* плодови од пиперка

Содржината на капсаициноот во плодови од разни видови на родот *Capsicum* е проблематика која е доста истражувана, но сеуште е занимлива. Постојат доста литературни податоци за различна содржина на капсаицин во различните видови на родот *Capsicum*.

Според Лазиќ (1995), во зачинската пиперка содржината на капсаициноот во свежа маса се движи околу 0,025%, додека во лутите видови може да достигне до 0,25%. Авторот Todd (1958), изнесува дека содржината на капсаициноот во комерцијално лутите пиперки се движи од 0,08% до 0,8% на свежа маса, а постојат и официјални податоци кои потврдуваат постоење на екстремно лути мексички видови во кои содржината на капсаицин се движи од 0,1% до 1,0 %.

За лутината кај различните видови на родот *Capsicum* вршени се и класификации и според вкупната содржина на сите капсаициноиди. Според оваа класификација слатки сорти се со 0,1-0,2%, средно лути 0,2-0,4%, лути 0,4-0,6% и многу лути сорти 0,6-1,0% па дури и до 1,4% капсаициноиди (Govindaraj, 1986).

Резултатите за содржината на капсаициноот во плодови на деветте различни по лутина сорти, покажуваат дека сортите златен медал, куртовска капија, калифорниско чудо, ротунд и фехерозон, според светската класификација, спаѓаат во слатки сорти. Лутите сорти феферона, слатко лута и везена лута и во светската класификација, по процентуалниот состав на капсаициноот, спаѓаат во лути сорти, но од екстремно лутите мексички видови далеку заостануваат по содржината на капсаициноот. Сортата сиврија која содржи  $532,44 \pm 34,58^{**}$   $\mu\text{g/g}$  или изразено во проценти  $0,0520 \pm 0,0033\%$  на свежа маса, според класификацијата на светските проценувачи на лутината на различните видови на пиперка, припаѓа на границата помеѓу слатките и средно лутите видови.

Резултатите добиени во истражувањата за содржината на капсаициноот во *in vivo* плодови на деветте различни сорти на пиперка се во согласност со светските проценки за лутината на видовите од родот *Capsicum*. Тоа значи дека, и по вкус, и по содржината на капсаициноот испитуваните сорти реално припаѓаат на соодветната група.

#### 4.3.2 Содржина на капсаицин во *in vitro* култури од пиперка

Мал е бројот на литературни податоци за содржината на капсаицин во *in vitro* култури на пиперка. И покрај тоа што постои иницијатива за биосинтеза на различни секундарни метаболити и алкалоиди во услови *in vitro*, за стимулирана продукција на секундарни метаболити во култури на пиперката, податоци не постојат. Всушност, нашите истражувања се прв чекор во испитувањето за содржината на капсаициноот во култура *in vitro*, а резултатите даваат можност за понатамошни размислувања за експлоатацијата и примената на овој алкалоид.

За содржината и стимулацијата на биосинтезата на капсаицин во култура на калуси од пиперка единствено дава податоци авторот Anchondo (2002). Тој во своите истражувања во MS медиумот додавал ферулична киселина и ванилин, кои се прекурсори во биосинтезата на капсаициноот. Анализата на калусните култури била извршена со помош на HPLC, и по две недели од додавањето на прекурсорите било забележано зголемена содржина на капсаицин, и тоа, за околу 7,5 пати во случај на додавање на ферулична киселина како прекурсор, и 6 пати во случај на додавање на ванилин. Резултатите на Anchondo (2002) укажуваат дека навистина постои биосинтеза на капсаицин, а со тоа и на него сличните капсаициноиди, во услови *in vitro*, но синџирот на нивната биосинтеза сигурно дека се одвива по некои алтернативни патишта, кои сеуште не се во целост откриени.

Резултатите од овие истражувања, за содржината на капсаицин во култура на пиперка *in vitro*, го потврдија фактот дека капсаициноот сепак се синтетизира и во култура на пиперка во *in vitro* услови. Наедно, потврдено е дека одредени хормони во MS медиумот имаат стимулативно дејство врз синтезата на капсаициноот во услови *in vitro*.

### **Култура на изданоци**

Во култура на изданоци, од сортите куртовска капија и златен медал, се покажа дека контролата (без хормонален третман) содржи најмалку капсаицин, и во двете испитувани сорти. Генетската предиспозиција за синтеза на капсаициноот се задржува и во *in vitro* услови, што е потврдено со тоа што контролните изданоци на сортата златен медал ( $271,31 \pm 60,15 \mu\text{g/g}$ ) содржат повеќе капсаицин во споредба со сортата куртовска капија ( $213,10 \pm 56,80 \mu\text{g/g}$ ). Така е и за содржината на капсаициноот во *in vivo* плодовите на овие 2 сорти, кај сортата златен медал изнесува  $324,27 \pm 70,2^* \mu\text{g/g}$  а кај куртовската капија  $271,10 \pm 5,04^* \mu\text{g/g}$ .

Сите испитувани хормонални третмани, во однос на контролата, покажаа повисока содржина на капсаицин и кај двете испитувани сорти. Во култура на изданоци, цитокинините покажаа изразито влијание врз биосинтезата на капсаициноот, и тоа BAP е со најизразен ефект за сортата куртовска капија, а за сортата златен медал е цитокининот KIN.

Од комбинациите ауксин/citoкинин во култура на изданоци најсилно влијание во зголемувањето на синтезата на капсаициноот има NAA/KIN ( $848,52 \pm 19,60^* \mu\text{g/g}$ ) за сортата куртовска капија, а за сортата златен медал NAA/BAP ( $794,00 \pm 4,51 \mu\text{g/g}$ ).

Кога би се направила споредба, за содржината на капсаициноот, помеѓу изданоците третирани со фитохормони во однос на тие кои се без хормонален третман (контролата), се гледа дека сите аплицирани комбинации и концентрации на регулаторите на растот ја зголемуваат биосинтезата на овој значаен алкалоид во услови *in vitro*.

### **Култура на калуси**

Анализата за содржината на капсаициноот во култура на калуси покажа дека и тие се способни стимулирано под одреден хормонален третман да синтетизираат капсаицин.

Во култура на калуси од меристем, ефектот на цитокинините е доста изразит, кај сортата куртовска капија најизразит е на BAP ( $537,73 \pm 6,78^{**} \mu\text{g/g}$ ), а кај сортата златен медал на ZEA ( $748,08 \pm 16,23^* \mu\text{g/g}$ ). Комбинациите на цитокинин/ауксин, исто така, стимулативно делуваат врз синтезата на капсаициноот а IAA/BAP и за двете испитувани сорти покажаа најсилен ефект.

Цитокининот ZEA, во култура на калуси од котиледони ја стимулира биосинтезата на капсаициноот најмногу од сите испитувани цитокинини и кај двете испитувани сорти. Комбинацијата IAA/BAP и за двете испитувани сорти ја зголемува синтезата на капсаициноот најмногу од сите испитувани ауксин/citoкинин комбинации во култура на калуси добиени од котиледони на пиперка.

Анализата на содржината на капсаициноот во калусни култури покажа дека калуси од меристем имаат незначително поголема содржина за разлика од калуси на котиледони, но и двете калусни групи заостануваат во поглед на културата на изданоци, каде за сите испитувани хормонални третмани е забележана поголема содржина на капсаицин.



## Култура на котиледони

Дури и котиледони во услови *in vitro* синтетизираат капсаицин по алтернативен пат. Вредностите за сите хормонални третмани во култура на котиледони, генерално се повисоки од оние во култури од калуси а пониски од културите на изданоци и кај двете сорти на пиперка. Од сите испитувани цитокинини ВАР најмногу ја стимулира биосинтезата на капсаициноот и кај двете сорти. За разлика од културите на изданоци и калуси на пиперка во култура на котиледони ауксиноот 2,4-D има најголем ефект во синтезата на капсаициноот и под негово влијание кај сортата куртовска капија се синтетизирале  $513,77 \pm 7,26 \mu\text{g/g}$ , а кај сортата златен медал содржината на капсаициноот е  $439,80 \pm 75,73 \mu\text{g/g}$ .

Како и во културите на калуси, така и во култура на котиледони, и кај двете сорти, од сите испитувани комбинации на ауксин/citoкинин, комбинацијата IAA/ВАР има најголемо влијание врз синтезата на капсаициноот.

Морфогенетскиот потенцијал за органогенеза на пиперка во услови *in vitro* во Република Македонија е делумно истражуван. Резултатите од овие испитувања комплетираат една целина која го отсликува реалниот регенеративен потенцијал на пиперката и се основа за согледување на понатамошните можности за истражување на оваа култура во услови *in vitro*. Нашите досегашните истражувања, за ефектот на различните регулатори на растот врз органогенезата на пиперка, се во склад со објавените резултати од автори кои работеле на оваа проблематика (Gatz и Rogozinska, 1994; Fari и соp., 1993; Ochoa-Alejo, 1992; Kenij и соp., 1991; Kisaburo и соp., 1988; Phillips i Hubstenberg, 1985; Gunai и Rao, 1977; Diaz и соp., 1988; Agrawal и соp., 1989; Fari и Czako, 1981; Sultanbawa и Phatak, 1991, Спасеноски и Колева, 1994, 1996; Колева и Спасеноски, 1995; Колева-Гудева, Митрев и Спасеноски, 2001; Колева-Гудева и Спасеноски, 2001).

Резултатите добиени од истажувањата за андрогенезата на пиперка се во согласност со резултатите од други автори (George и Narayanaswamy 1973; Mityko и соp., 1995,1997; Dolcet-Sanjuan и соp., 1997; Dumas de Valux 1981;).

Од истражувањата за содржината на капсаицин во услови *in vitro*, се констатира дека, истиот се синтетизира и во култура на пиперка, Што е докажано и од страна на авторот Anchondo (2002).

## 5. ЗАКЛУЧОЦИ

Резултатите од истражувањата за андрогенетскиот и органогенетскиот потенцијал на пиперка *Capsicum annuum* L. во услови *in vitro*, и за содржината на капсаицинот во *in vivo* плодови и *in vitro* култури на изданоци, калуси и котиледони од пиперка, овозможуваат да се извлечат следните заклучоци:

- Стерилизација на незрели цветни пупки успешно може да се изврши со 5% Ca(ClO)<sub>2</sub> со 2-3 капки Tween 20 за краток временски период од 10 минути, а семето со 1% NaClO за период од 10 минути.

- На медиумите MS + 1,0 mg/l KIN + 0,01 mg/l 2,4 D + 0,001 mg/l IAA и на N + 1,0 mg/l KIN + 0,001 mg/l IAA, со инкубација 7 дена на темно и на +25±2°C, а потоа во клима комора на +25±2°C, со фотопериодизам од 12 часа светло и 12 часа темно, антерите од пиперка имаат висок потенцијал за калусогенеза, лутите сорти калусираат најмногу (30-58%), пред слатките (11-14%), доматовидната сорта (9-10%) и бабурестите сорти (4-10%) кои најслабо калусираат.

- На медиумот LS + 3,0 mg/l KIN + 1,0 mg/l IAA и на двофазниот медиум NN + 0,01 mg/l KIN + 0,001 mg/l 2,4-D, со инкубација 7 дена на темно и на +7±2°C, а потоа во клима комора на +25±2°C, со фотопериодизам од 12 часа светло и 12 часа темно, калусирањето е со поголем интензитет, но во умерени граници (луте сорти 5-34%; слатки сорти 8-18%; бабурести сорти 1-17%; доматовидна сорта 9-17%).

- Единствено на медиумот CP + 0,01 mg/l KIN + 0,01 mg/l 2,4-D, со инкубација 8 дена на темно и на +35±2°C, следните 4 дена во клима комора на +25±2°C со фотопериодизам 12 h светло / 12 h темно, а потоа на R<sub>1</sub> + 0,01 mg/l KIN на +25±2°C, со фотопериодизам 12 часа светло и 12 часа темно, добиени се хаплоидни ембриоиди, но калусирањето е минимално.

- На CP медиум (Dumas de Valux, 1981), од сите девет испитувани, сорти пет покажаа способност за формирање на хаплоидни ембриоиди, и тоа:

- слатко лута - (2,43±0,20%), со слаб андрогенетски потенцијал,
- златен медал - (3,31±0,24%), со слаб андрогенетски потенцијал,
- куртовска капија - (1,55±0,50), со слаб андрогенетски потенцијал,
- калифорниско чудо - (6,16±0,28%), со просечен андрогенетски потенцијал,
- фехерозон - (33,66±6,02%), со одличен андрогенетски потенцијал.

- Цитокинини предизвикуваат калусирање и формирање на лисни розети кај котиледони од пиперка, најголем ефект врз органогенетскиот потенцијал на котиледони има 2iP, по него следат BAP и ZEA, а KIN има најслабо влијание.

- Комбинацијата IAA/BAP стимулира калусогенеза и формирање на лисни розети, а со NAA/BAP се индуцира и ризогенеза кај котиледони од пиперка, додека NAA ја фаворизира само ризогенезата на котиледони од пиперка.

- Морфогенетскиот потенцијал за органогенеза низ целата должина на котиледонот не е еднаква. Базалните делови имаат најголема регенеративна способност, следат медиалните, па апикалните сегменти.

- Апикални пупки од пиперка за само неколку ден на MS медиум формираат изданок и имаат голем морфогенетски потенцијал за регенерација во *in vitro* услови.

- Органогенезата кај апикалните пупки од пиперка под влијание на цитокинини е во правец на формирање на лисни розети и калус. Најголемо влијание врз органогенетскиот потенцијал на апикалните пупки се постигнува во присуство на 2iP, по него следат BAP и ZEA, а KIN има најслабо дејство.

- Хормоналната комбинација IAA/BAP во MS медиумот, врз органогенезата на пиперка, резултира со калусирање и формирање на лисни розети во доста високи проценти, додека NAA/BAP освен формирање на лисни розети и калусогенеза стимулира и ризогенеза.

- Најдобро вкоренување на изданоци на пиперка во услови *in vitro* е постигнато во присуство на ауксинот NAA, а најдобар медиум за вкоренување е MS + 0,04 mg/l IAA + 0,1 mg/l NAA, (куртовска капија 91,57%, златен медал 96,25% вкоренување).

- Сортата златен медал е порегенеративна од сортата куртовска капија во услови *in vitro*, а има и поголем афинитет за вкоренување, но во фазите на аклиматизација, од стерилни во нестерилни услови, сортата куртовска капија е поадаптибилна и поднесува помалку загуби од сортата златен медал.

- Резултатите за содржината на капсаицинот во *in vivo* плодови на деветте различни сорти на пиперка се во границите со светските проценки за лутината на видовите на родот *Capsicum*, и по вкус и по содржината на капсаицинот испитуваните сорти реално припаѓаат на соодветната група, лути сорти 618-901  $\mu\text{g/g}$ ; слатки сорти 271-532  $\mu\text{g/g}$ ; бабурести сорти 201-234; домотовидна сорта 216  $\mu\text{g}$  капсаицин /g свежа маса.

- Способноста за биосинтеза на капсаицин во култура на пиперка во услови *in vitro* е евидентна, така што, во култура на изданоци синтезата на капсаицин е најголема (213-992  $\mu\text{g/g}$ ), нешто помала е во култура на котиледони (189-753  $\mu\text{g/g}$ ), а најмала во култура на калуси (96-740  $\mu\text{g/g}$ ).

- Цитокинини ја стимулираат синтезата на капсаицин во услови *in vitro*, а ВАР и ZEA имаат најголемо влијание. Од комбинациите ауксин/citoкинин, IAA/ВАР најмногу ја поттикнува биосинтезата на капсаицин (256-753  $\mu\text{g/g}$ ).

- Истражувањата за органогентскиот потенцијал и регенеративната способност на пиперка *Capsicum annuum* L. во услови *in vitro*, имаат не само фундаментален, туку и апликативен карактер, и претставуваат основа за понатамошните истражувања на оваа и на други култури во *in vitro* услови.

- Добиените хаплоидни ембриоиди од повеќе сорти на пиперка *Capsicum annuum* L., во *in vitro* услови, се првите хаплоиди на пиперка добиени во Република Македонија, што може да послужи како пример за андрогенетски протокол и кај повеќе култури.

- Испитувањата за ефектот на растителните регулатори на раст врз продукцијата на капсаицин во *in vitro* култури од пиперка *Capsicum annuum* L. се првите истражувања од ваков тип во Република Македонија, и имаат елементарна основа за искористување и продукција на овој значаен алкалоид.

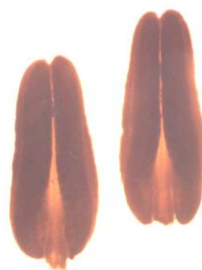
- Истражувањата од оваа докторска дисертација ќе дадат огромен придонес за разбирањето, употребата и користењето на методот *in vitro* за понатамошни научни, фундаментални и апликативни проекти.

- Со оглед на тоа што, продукцијата на капсаицин во *in vivo* и *in vitro* услови во Република Македонија воопшто не е истражувана, сметаме дека, резултатите од нашите испитувања би биле од посебно значење за понатамошните истражувања, на овој природен алкалоид, во растителната биохемија и физиологија, како и за неговата примена во медицината, фармацијата, технологијата и земјоделството.

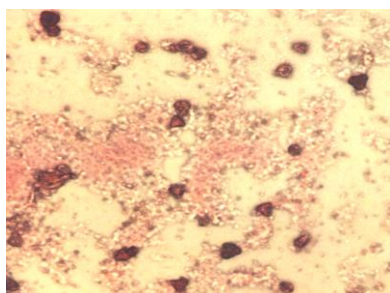
## ПРИЛОГ – ИЗБОР НА ФОТОГРАФИИ ОД ИСТРАЖУВАЊЕТО



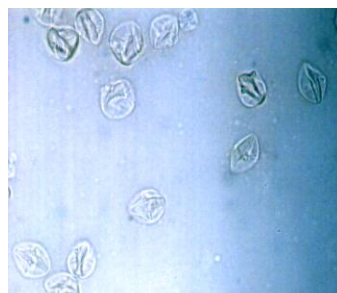
Фот. 1 Разни фази од развојот на цветови на пиперка



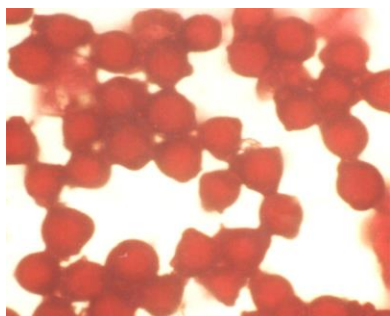
Фот. 2 Изолирани антери од цветови на пиперка



Фот. 3 Микроспори од пиперка во различни стадиуми на развој



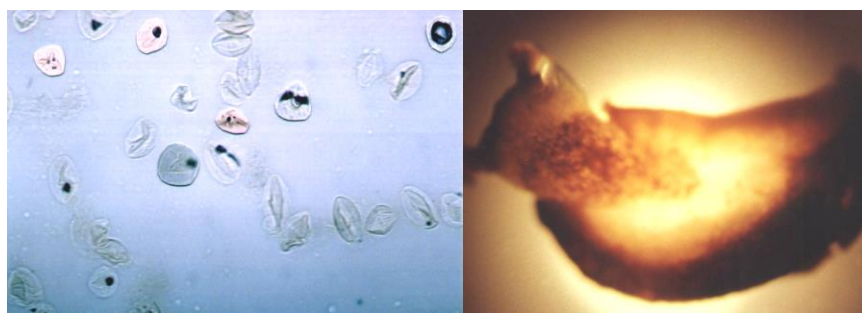
Фот. 4 Микроспори пред првата поленова митоза



Фот. 5 Зрели поленови зрна (обоени со ацето-кармин)



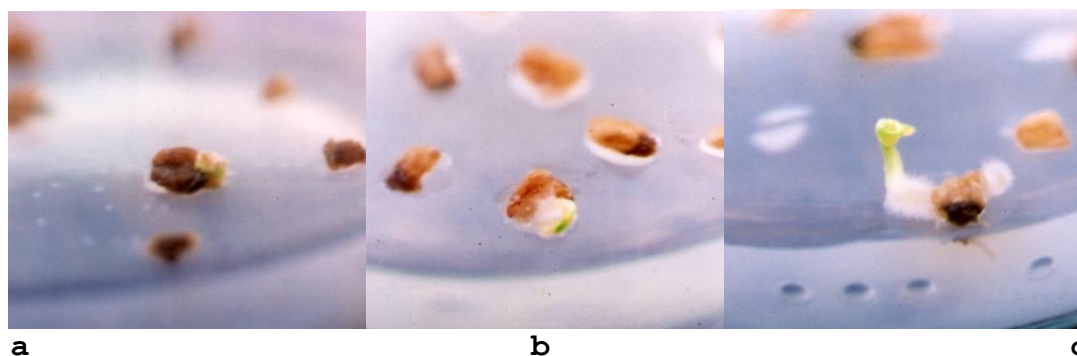
Фот.6 Антери од пиперка поставени на индукционен медиум



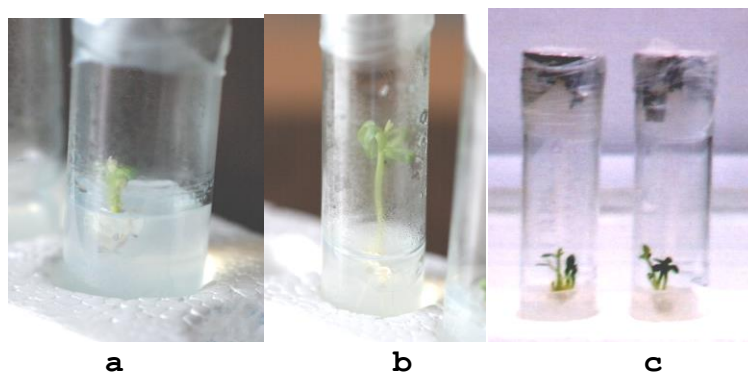
а

б

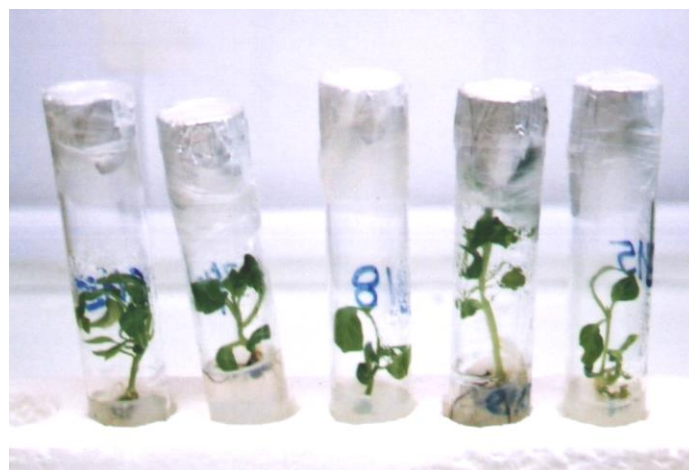
Фот. 7 а) Делба на микроспори од пиперка во услови *in vitro*  
б) Појава на ембрионид од антера во торпедо форма



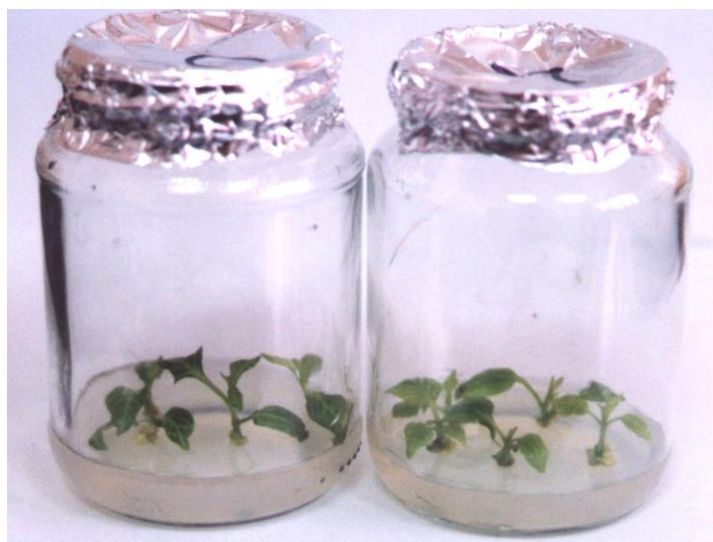
Фот. 8 а) Појава на ембриогенетско ткиво на CP медиум  
б) Појава на тотипотентен ембриод на R<sub>1</sub> медиум  
с) Формирање на изданок на R<sub>1</sub> медиум



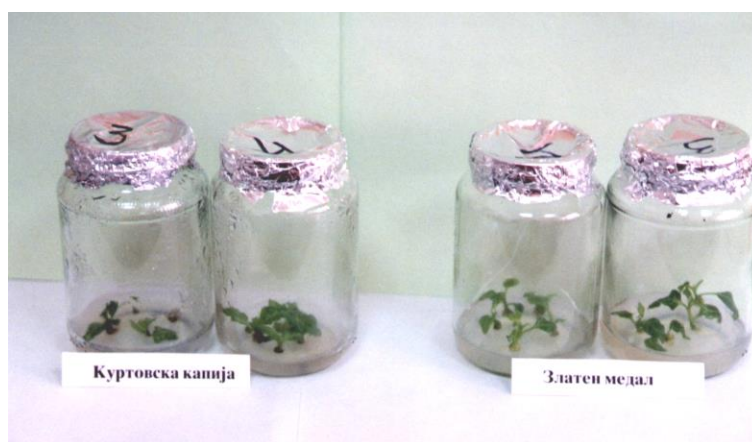
Фот. 9 а) Развој на ембриод на V<sub>3</sub> медиум  
б) Вкоренување на ембриод од пиперка на V<sub>3</sub> медиум  
с) De novo формирање на ембриоди на V<sub>3</sub> медиум



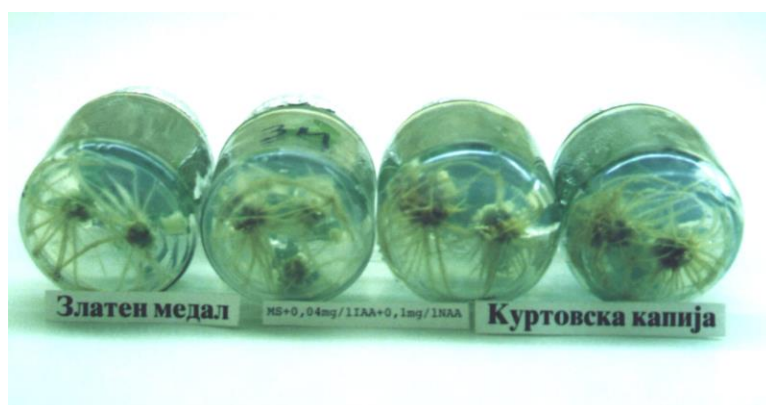
Фот. 10 Култура на хаплоидни изданци од пиперка на V<sub>3</sub> медиум



Фот. 11 Развој на апикални пупки од пиперка на MS медиум



Фот. 12 Формирање на изданоци од пиперка (*Capsicum annuum* L.) сорти Куртовска капија и Златен медал



Фот. 13 Вкоренување на изданоци од пиперка (*Capsicum annuum* L.) сорти Куртовска капија и Златен медал на MS+0,04 mg/l IAA + 0,1 mg/l NAA

## 7. ЛИТЕРАТУРА

- Aczél A. (1986): Application of Overpressured Layer Chromatography in Red Pepper Analysis. Study of the Carotenoids Responsible for the Red Color in Ground Red Pepper, *Jour. High Resolution Chromatography*, Vol. 9:407-409.
- Agraval, S., Chandara, N. и Kothari, S.L. (1989): Plant regeneration in tissue cultures in pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Mathania), *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 16: 47-55.
- Алаџајков, Л. (1966): Специјално Градинарство, *Издание на универзитетот во Скопје*.
- Алаџајков, Л. (1966): Општо Градинарство, *Издание на универзитетот во Скопје*.
- Anchondo, R. (2002): Changes in the levels of capsaicin during callus growth of jalapeño peppers as a result of the presence of biosynthetic precursors and microbial elicitors, *Proceedings of the 16<sup>th</sup> International Pepper Conference, Tampico, Tamaulipas, Mexico*.
- Archer, E.V., Jones D.W. (2002): Capsaicin pepper, cancer and ethnicity, *Medical Hypotheses*, 59 (4): 450-457.
- Arroyo, R. и Revilla, M.A.(1991): *In vitro* plant regeneration from cotyledon and hypocotil segments in two bell pepper cultivars. *Plant Cell Reports* 10: 414-416.
- Barbani, G., Maggi, C.A., Beneforti, P., Baroldi, P., Turini, D. (1993): Relief of pain following intravesical capsaicin in patients with hypersensitive disorder of the lower urinary track. *Br. J. Urol.* 71 (6): 686-691.
- Bernstein, J.E. (1991): Composition for training nasal disorders an headaches – solution or suspension of capsaicin local anesthetic, *Galenpharma Inc. US 5008289*.
- Bernstein, J.E. (1991): Method and composition for training painful inflammatory or allergic disorders – cis 8- methyl – N – vanillyl – 6 – noneamide, *Cisco Ltd Partnership, US 5063060*.
- Bernstein, J.E. (1991): Method and composition utilizing capsaicin external analgetic – with anesthetic desensi, *Galenpharma Inc. US 4997853*.
- Bernstein, J.E. (1985): Method and composition for treating post-neuralgia – trans-8-methyl-N-vanillyl-6-noneamide an analgesic, *Dermatological Enterprises Ltd, US 4536404*.
- Bhojwani, S.S. (1990): Plant Tissue Culture, Application and Limitation, *Department of Botany, Univ.of Delhi, India*.
- Binzel, M. L. и соп. (1995): Induction of direct somatic embriogenesis and plant regeneration in pepper (*Capsicum annuum* L.), *Plant Cell Reports* 15: 536-540.
- Boucher Y. (2002): Capsaicin induces a punctuate pattern of plasma extravasication on the tongue, *IADR/AADR/CADR, General Session 2002: 6-9*.
- Bunk, S. (2000): Cloning the Capsaicin Receptor, *The Scientist*, 14 (2):19.
- Buttery R.G. и соп. (1969): Characterization of Some Volatile Constituents of Bell Peppers, *J. Agr. Food Chem. Vol. 17 (6): 1322-1334*.
- Buyukalaca, S. и Mavituna, F. (1996): Somatic embryogenesis and plant regeneration od pepper in liquid media. *Plant Cell, Organe and Tissue Culture* 46:227-235.



- Cargill, Anne M. и соp. (1997): Characterization and Quantitation of Capsaicin in Natural Commercial Products by HPLD-UV and Electrospray-LCM, *ASMS 1997*.
- Chancellor M.B., Groat W.C. (1999): Intravesical capsaicin and resiniferatoxin therapy: spicing up the ways to treat the overactive bladder. *J. Urol.* 162 (1): 3-11.
- Chandirmani, V.A., Peterson, T., Duthie, G.S., Fowler, C.J. (1996): Urodynamic changes during therapeutic intravesical instillation of capsaicin. *Br. J. Urol.* 77 (6): 792-797.
- Chang, C.L., Liu J.C., Chang, S.Y., Ma C.P., de Groat W.C. (1999): Effect of capsaicin on the micturition reflex in normal and chronic spinal cord-injured cats. *Am. J. Physiol.* 277 R7: 86-94.
- Collin H. A. и Edwards S. (1998): Plant Cell Culture, *BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK*.
- Cruz, F. (1998): Desensitisation of bladder sensory fibbers by intravesical capsaicin or capsaicin analogises. *Int. Urogenecol. J. Previc. Floor. Dysfunct.* 9 (4): 214-220.
- Cruz, F., Guimaraes, M., Silva, C., Rio, M.E., Coimbra, A., Reis, M. (1997): Desensitization of bladder sensory fibers by intravesical capsaicin has long lasting clinical and urodynamic effects in patients with hyperactive or hypersensitivity bladder dysfunction. *J.Urol.* 157 (2): 585-589.
- Curry, J., Maneesha, A., Mandoza, M., Nevarez, J., Melendrez, M., O`Connell (1999): Transcript for possible capsaicinoid biosynthetic genes are differentially accumulated in pungent and non-pungent *Capsicum* spp. *Plant Science.* 148 (1): 47-57.
- Curry, J., Mandoza, M., O`Connell (1998): Nucleotide sequence of a caffeic acid 3-O-Methyltransferase gene (accession No.AF081214) from habanero chilli, *Plant Physiol.* 118:711-6.
- Davison, M.W. (2000): Capsaicin – Molecular Expressions: Phytochemical Gallery, Florida State University, National High Magnetic Field Laboratory, <http://micro.magnet.fsu.edu/>
- Dasgupta, P., Chandirmani, V., Parkinson, M.C., Beckett, A., Fowler, C.J. (1998): Treating the human bladder with capsaicin: Is it safe? *Euro. Urol.* 33 (1): 28-31.
- David E. Henderson и Adam M. Slickman (1999): Quantitative HPLC Determination of the Antioxidant Activity of Capsaicin on the Formation of Lipid Hydroperoxides of Linoleic Acid: A Comparative Study against BHT and Melatonin, *J. Agric. Food Chem.*, 47 (7): 2563-2570.
- De la Mar, R., Francis, F.J. (1969): Carotenoid degradation in blacked paprika, *J. Food. Sci.* 34, 287.
- De Ridder, D., Chandirmani, V., Dasgupta, P., Van Poppel, H., Flower, C.J. (1997): Intravesical capsaicin as a treatment for refractory destructor hyperreflexia: *J. Urol.* 158 (6): 2087-92.
- De Seze, M., Wiart, L., Ferriere J.M., de Seze M.P., Joseph, P.A., Barat, M. (1999): Intravesical installation of capsaicin in urology: from pharmacological principles to therapeutic application. *Prog. Urol.* 9 (4): 615-632.
- De Seze, M., Wiart, L., Ferriere J.M., de Seze M.P., Joseph, P.A., Barat, M. (1999): Intravesical installation of capsaicin in urology: A rewy of the literature. *Eur.Urol.* 36 (4): 267-277.
- De Seze, M., Wiart, L., Joseph, P.A., Dosque J.P., Mazaux J.M., Barat, M. (1998):

- Capsaicin and neurogenic destructor hyperreflexia: a double-blind placebo-controlled study in 20 patients with spinal cord lesion. *Neurorol. Urodyn.* 17(5):513-523
- De Witt, D. (2000): Creams, Sprays, Gels, Stics, Powders and Compounds a Capsaicin Update, 2000, *The Healing Powers of Peppers*.
- De Witt, D. (1999): The nature of capsaicin, *The Chile Pepper Encyclopedia*.
- Diaz I., Moreno R. i Power J.B. (1988): Plant regeneration from protoplast of *Capsicum annuum* L. *Plant Cell Reports* 7:210-212.
- 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.
- Donner, J., Amann, R., Schuligoi, R., Skofitsch, G. (1996): Complete recovery by nerve growth factor of neuropeptide content and function in capsaicin-impaired sensory neurons. *Brain Res.* 741 (1-2) 103-108.
- 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.
- Ebida, A.I.A. i Hu, C.Y. (1993): *In vitro* morphogenetic response and plant regeneration from pepper (*Capsicum annuum* L.cv. Early California wonder) seedling explants. *Plant Cell Reports*, 13 107-110.
- FAO, statistical data bases, [http:// www.Fao.org](http://www.Fao.org)
- Fari, M. (1993): Tissue culture and gene transfer systems in pepper *Capsicum annuum* L. *Capsicum Newsletter, (Spacial Issue):* 243-248.
- Fujimura, T., Romaine, A. (1975): Effects of growth regulators on embriogenesis in a carrot suspension. *Plant Science Letters.*, (5): 359-364.
- Fujimura, T., Komamine, A. (1979): Involvement of endogenous auxin in somatic embriogenesis in a carrot cell suspension culture. *Zeitung Pflanzenphysiologia* (95):13-19.
- Fujimura, T., Komamine, A. (1980): The serial observation of embriogenesis in carrot cell suspensions. *The new Phytologist*, 86: 213-218.
- Fujiwake, T., Suzuki, T., Oka, S., Iwai, K. (1982): Cell accumulation of capsaicinoids, *Agric. Biol. Chem.* 46: p2685.
- Garcia P., Candela M.E. (1996): Hypersensitive like Response of pepper *Capsicum annuum* L. cells to Phytophthora capsici: *Physiologia Plantarum* 98:737-742.
- Gatz A., Rogozinska J. (1994): *In vitro* organogenetic potential of cotyledon and leaf explants of *Capsicum annuum* L., cv. bryza, *Acta Societies botanicorum Poloniae, Vol. 63 No. 3-4:* 255-258.
- George L., i Narayanaswany, S. (1973): Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis, *Protoplasma* 78, 467-470.
- George, E.F. (1996): Plant Propagation by tissue culture: *Dianthus* spp. and hybrids. Part 2 In Practices. Exegetics Ltd. Edington. England.
- Govindarajan, V.S. (1986): Capsicum- production, technology, chemistry and quality - Part III. Chemistry of the colour, aroma and pungency stimuli, *CRC, Critical Review in Food Science and Nutrition.* 24 (3): 254-355.
- Govindarajan, V.S. (1985): Capsicum- production, technology, chemistry and quality - Part II. Processed products, standards world production and trade, *CRC, Critical Review in Food Science and Nutrition.* 23 (3): 207-288.
- Govindarajan, V.S. (1985): *Capsicum*- production, technology, chemistry and quality - Part I. Botany, cultivation and primary processing, *CRC, Critical Review in Food Science and Nutrition.* 22 (2): 109-176.

- Gunay A.L., Rao P.S. (1978): *In vitro* plant regeneration from hypocotyls and cotyledon explants of red pepper (*Capsicum*). *Plant Science letters*, 11: 365-372.
- Narini, I. и Sita, G.L. (1993): Direct somatic embriogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science* 89:107-112.
- Holt, S.D. (1999): Pain reliever and method of use – capsaicin entrant analgesic, *Medical Merchandising Inc, US 5856361*.
- Jeong, W.J. и сор. (1994): Somatic embriogenesis and plant regeneration in immature zygotic embryo cultured of hot pepper (*Capsicum annuum* L.), *Korean J. Plant Tissue Culture, Vol. 21. No. 5:299-302*.
- Капаракис, G. (1999): *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.), *PhD theses - Kaparakis Georgis, Aristotle Univ. Hellas, submitted Univ. Nottingham, UK*.
- Kenneth T. Hartman, (1970): A Rapid Gas-Liquid Chromatographic Determination from Capsaicin in *Capsicum* spices, *Jour. of Food Science, Vol. 35: 553-547*.
- Кениј К. и сор.. (1991): Effect of interaction between Variety and culture medium on induction capacity of adventitious bud from cotyledon explant in pepper *Capsicum annuum* L., *Research Reportes of Kochy Unyversity, Vol. 40: 19-32*.
- Kim, D.J., Chancellor M.B. (2000): Intravesical neuromodulatory drugs: capsaicin and resiniferatoxin to treat the overactive bladder. *J Endourol. 14 (1): 97-103*.
- Kisaburo, H. и сор. (1988): The effect of cotyledon explants and culture condition on *in vitro* formation of adventios buds in red pepper *Capsicum annuum* L., *Research Reportes of Kochy Unyversity, Vol. 37: 153-159*.
- Колева-Гудева Лилјана, Спасеноски, М., Митрев, С. (2001): Можности за примена на некои нови методи за добивање на безвирусен посадочен материјал. *Год. збор. Инст. за јужни земјоделски култури Струмица 1: 37-45*.
- Колева Лилјана, Спасеноски, М. (1996): Можности за вегетативно размножување на пиперка (*Capsicum annuum* L.) во услови *in vitro*, 1 Конгрес на биолозите на Македонија, Охрид, сеп. 1996, *Зборник на апстракти: 78 - 78*.
- Колева- Гудева Лилјана, Спасеноски, М. (1997): Содржина на некои биогени елементи и други физиолошки карактеристики кај пиперката (*Capsicum annuum* L.) добиени во *in vitro* и во надворжшни услови, *Годишен зборник на земјоделски факултет, Скопје, Вол. 42: 77-83*.
- Koleva-Gudeva Liljana, Sapenoski, M., (2001): The effect of some cytokinines on pepper organogenesis (*Capsicum annuum* L. cv. Kurtovska kapija and Zlaten medal) cultured *in vitro*. *Yearbook Institute of Southern Crops, Vol 1:31-35*.
- Koleva Liljana, Spasenoski, M. (1995): Some morphological and Biological Characteristics of Pepper produced under *in vitro* conditions, *Acta Horticulturae, No 462, Vol 2: 721-725*.
- Колева Лилјана, Спасеноски, М., (1995): Одледување на врвни пупки од пиперка (*Capsicum annuum* L.) сорта куртовска капија во култура *in vitro*, и добивање на здрави растенија, *Годишен зборник за заштита на растенија, Вол 6: 237 - 242*.
- Колева Лилјана (1995): Органогенеза и регенерација на пиперка (*Capsicum annuum* L.) сорта куртовска капија во услови *in vitro*, *Магистерски труд, П.М.Ф, Универзитет Св. Кирил и методиј, Скопје Македонија*.

- Колева Лилјана, Спасеноски, М., (1995): *In vitro* органогенеза на хипокотили и котиледони од пиперка (*Capsicum annuum* L.) сорта куртовска капија, *Годишен зборник Биологија 199*, Вол. 48: 21-32..
- Košťálová, D., (2002): Topical capsaicin in dermatological and peripheral pain disorders, *Katedra farmakognózie a botaniky Farmaceutická fakulteta UK, Bratislava*.
- 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.
- Kurita, S. (2002): Studies on the antimicrobial mechanisms of capsaicin using yeast DNA microarray, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66(3): 5320536.
- Kwang, S.R., и сор. (1994) Effect of NaCl on seedling growth and induction of shoot in cultured tissue of *Capsicum annuum* L., *Korean J. Breed.*, 26 (3): 231-237.
- Kwang-Woong Lee (1998): Isolation and Characterization of o-Diphenol-O-Methyltransferase c DNA Clone in Hot Pepper, *Theses for Master's Degree, Dep. of Biology, Seoul National University, Seoul, Korea*.
- Лазич Бранка (1995): Повртарство, Паприка (*Capsicum annuum*), *Пољопривредни факултет, Универзитет Нови Сад, Југославија*.
- Lazzeri, M., Spinelli, M., Beneforti, P., Zanollo, A., Turini, D. (1998): Intravesical resiniferatoxin for the treatment of detrusor hyperreflexia refractory to capsaicin in patients with chronic spinal cord diseases. *Scand J. Urol. Nephrol.* 32(5): 331-334.
- Lazzeri, M., Spinelli, M., Beneforti, P., Turini, D. (1997): Urodynamic effects of intravesical resiniferatoxin in humans. *J Urol.* 158 (6): 2093-2096.
- Lazzeri, M., Spinelli, M., Beneforti, P., Benami, G., Maggi, C.A., Lecci, A., Turini, D., (1996): Intravesical capsaicin for treatment of severe bladder pain. *J. Urol.* 156 (3): 947-952.
- Lazzeri, M., Barbanti, G., Beneforti, P., Maggi, C.A., Taddeil, I., Andrea, U., Cantini, C., Castellani S, Turini, D. (1995) Vascular-renal reflex: diuresis and natriuresis activated by intravesical capsaicin. *Scand J. Urol. Nephrol.* 29 (1): 39-43.
- Margaret D. Collins и сор. (1995): Improved Method for Quantifying Capsaicinoids in *Capsicum* Using HPLC, *Hort. Science*, Vol. 30 (1):137-139.
- Maria A., Bernal A., Barcelo, R. (1996): 5,5'-Dicapsaicin, 4'-O-5-Dicapsaicin Ether and Dehydrogenation Polymers with High Molecule Weight are the Main Products of the Oxidation of Capsaicin by Peroxides from Hot Pepper, *J. Agric. Food Chem.*, 44 (10): 3085-3089.
- Матвејева Јана (1983): Систематика на Вишите растенија (Cormophita), *НИО Студенски збор, Скопје*.
- Mathews, V.H., Rao P.S. (1984): *In vitro* response of black pepper (*Pepper nigrum*), *Current Science*, Vol. 53, No.4.
- Mathew, A.G., Lewis, Y.S., Jagadishan, R., Nambudiri, E.S., Krishnamurthy, N. (1971): Oleoresin Capsicum, *The Flavor Industry*, apr. 1971: 23-27.
- Matsubara, S., Hu, K. и Murakami, K. (1992): Embryoid and callus formation from pollen greins of eggplant and pepper by anther culture. *Journal of the Society of Hortycultural Science* 61: 69-77.
- Mityko, Judit, и Fari M., (1997): Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther and microspore culture, *Hort. Biotech and breeding, ISHS 1997, Acta Hort.* 447: 281-287.
- Mityko, Judit (1996): Anthere Culture in pepper (*Capsicum annuum* L.), International Symposium and Training course in plant Biotechnology, Agricultural Biotechnology Center, Gödöllő, Hungary, *Labaratory manual* 1-8.

- Mityko, Judit Andrasfalvy, G., Csillery, G., Fary. M. (1995): Anther culture response in different genotypes and F<sub>1</sub> hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.), *Plant Breeding* 114, 78-80.
- Mityko, Judit (1993): Obtention of Anther derived homozygous plants in pepper (*Capsicum annuum* L.), *OMFB, Hungary No. 93-97-44-0468*.
- Munyon, I.P., Hubstenberg, J.F. и Phillips, G.C.: (1989): Oring of plantlets and callus obtained from chile pepper anther cultures. *In vitro Cellular and Developmental Biology* 25:293-296.
- Murashige, T., и Skoog, F. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assay with tobacco tissue cultures, *Physiologia Planatarum, Vol. 15: 473-497*.
- Murashige, T. (1979): Principles of rapid propagation, Propagation of higer plants through tissue culture, *Physiologia Planatarum, pp 14-24.*
- Myung-Jong, J., Kosuke, H., Kenshi, H., Kiyoshi, T. (2002): Discrimination of pugent pasting substance using surface-polarity controlled sensor with inderect in situ modification. *Science Direct, Sensore and Actuators B89 150-157*.
- Numazaki, M., Tominaga, T., Toyooka, H., Tominaga, M. (2002): Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 protein cinase Cepsilon and identification of two target serine, *J. Biol. Chem* 277 (16) 13375-8.
- Ochao-Alejo, N. и Carcia-Bautista, M.A.R. (1990): Morphogenetic response *in vitro* of hypocotyl tissues od chilli peppers (*Capsicum annuum* L.) to growth regulators. *Turrialba* 40: 311-318.
- Ochao-Alejo, N. и Ireta-Moreno, L. (1992): Cultivar difference in shoot-forming capacity of hypocotyl tissues of chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) cultured *in vitro*. *Scienta Hortyculturae* 42: 21-28.
- Park, K., Brown P.D., Kim Y.B., Kim, J.S. (2003): Capsaicin modulates K<sup>+</sup> currents from dissociated rats taste receptor cells, *Brain Research*, 962 (1-2): 135-143.
- Petersen, T., Nielsen, J.B., Schroder, H.D. (1999): Interavesical capsaicin in patients with detrusor hyper-reflexia—a placebo-controlled cross-over study. *Scand. J. Nephrol.* 33 (2): 104-110.
- Phillips C.G., Hubstenberger F.J. (1985): Organogenesis in pepper tissule cultures, *Plant Cell and Tissue Organ Culture* 4: 261-269.
- Pierik R.L.M. (1998): *In vitro* Culture of Higher Plants, *Department of Horticulture, Wageningen Agricultural University, The Netherland*.
- Relly C.A. и соп. (2002): Determination of Capsaicine, ninivamide, and dihydrocapsaicin in blood and tissue by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Anal Toxicil* 2002, Vol. 26, Issue 6 : 313-319.
- Rocha-Herra A.R., Wilson L.A. (2002): Evaluation of the Extyraction of Capsaicin in Hot Salsas, *Dep of Food Engineering, Univ. of the Americas-Pubela, Sta. Catarina Pubela, Mexico*.
- Santos-Diaz, M.S., Ochoa-Alejo, N. (1994): PEG-tolerant cell clones of chili pepper: Growth, osmotic potentials and solute accumulation, *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 37: 1-8.
- Santos-Diaz, M.S., Ochoa-Alejo, N. (1993): Effect of water stress on growth, osmotic potential and solute accumulation in cell cultures from chili pepper (a mesophyte) and creosote bush (a xerophyte), *Plant Science* 96: 21-29.
- Sasson A. (1991): Production of useful biochemicals by higher-plant cell cultures: biotechnological and economic aspects, *CHIEAM, Options Mediterraneennes, No 14: 59-74*.
- Saxena, P.K., Gill, R., Rashid, A., Maheshwary, S.C. (1981): Isolation and culture of

- protoplasts of *Capsicum annuum* L. and their regeneration into plants flowering *in vitro*. *Protoplasma* 108:357-360.
- Skoog F., Miller C.O. (1957): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symp. Soc. Exp. Biology*. 126:118-131.
- Спасеноски М., Колева Лилјана (1995): *In vitro* размножување на пиперка (*Capsicum annuum* L.) сорта Куртовска капија, XI Симпозиум на Југословенското друштво за физиологија на растенијата, Нови Сад 1995, Изводи саопштенија: 143 - 143.
- Спасеноски, М., Лилјана Колева (1994): Регенерација на пиперката (*Capsicum annuum* L.) од апикални пупки во услови " *in vitro*", Нови технологии во градинарството и цвеќарството, Зборник на трудови I: 203 - 209.
- Спасеноски, М. (1993): Вегетативно размножување кај некои растителни видови во услови *in vitro* и можност за добивање на здрав растителен материјал, *Годи. Збор. за заштита на растенијата* (5): 145 - 148.
- Subhash, K. i Christopher, T. (1988): Direct plantlet formation in cotyledon cultures of *Capsicum frutescens*. *Current Science*, 57:99-100.
- Sultanabawa, D.S. и Phataks, P.N. (1971): Propagation of ornamental pepper by cuttings and *in vitro* shoot-tip culture. *HortScience*, 26, 1078.
- Suzuki, T., Iwai, K. (1984): The alkaloids: *Chemistry and Pharmacology* (23) p228.
- Suzuki J.I., Tausing, F. Morse R.E., (1956): Some Observation on Red Pepper. I. A New Method for the Determination of Pungency in Red Pepper. *Food Tech* (1957):100-104.
- Surh, J. (2002): More than spain: capsaicin in hot chili peppers makes tumor cells commit suicide. *J. Nat. Cancer Inst Vol. 94* (17): 1263-5.
- Tappyuthpijarn P. i sor. (1999): Study of Capsaicin Preparation from *Capsicum Frutescens* L. used for the Treatment of Hyperactive Neuro-Genic Bladder (No. 384), Dep. of Pharmacology, Mahidol Univ.
- Trejo-Gonzalez A. i Wild-Al-Tamirano C., 1973: A New method for determination of Capsaicin in Capsicum Fruits, *J. of Food and Science*, Vol. 38: 342-344.
- Tod, J., i Catt, N. (2002): Red "why are they so hot" chilli peppers, *Keble College, Oxford*. <http://www.chem.ox.ac.uk>
- Todd, P.H., Jr. (1958): Detection of foreign pungent compounds, *Food Technology* sep`58: 168-470.
- Todd, P.H., Jr. (1977): Determination of Pungency due to Capsicum by Gas-Liquid Chromatography, *Journal of Food Science*, Vol. 42 (3): 660-665.
- Todd, P.H., Jr. (1961): Gas Liquid Chromatographic Analysis of Capsicum Amides, *Food Technology*, May, 1961: 270-272.
- Tominaga, M. i sor. (1998): The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain product stimull, *Neuron*, 21 (3): 644-645.
- Valera-Montero, L.L. i Ochoa-Alejo, N. (1992): A novel approach for chilli pepper (*Capsicum annuum* L.) plant regeneration: shoot induction in rooted hypocotyls. *Plant Science* 84: 215-219.
- Walter, W.R. (1995): Wax and Capsaicin based pesticide, *Wilder Agricultural Product Co Inc. US 5466459*
- Wang T.L. i Cumin A. (1996): Embriogenesis the generation of the plant, Inst. of Enviromental and Biological Science, Div. of Biological Science, Univ. of Lancaster, UK.
- Wein, A.J. (2001): Pharmacological agents for the treatment of urinary incontinence

- due to overactive bladder. *Expert Opin Investrg. Drugs*. 10 (1): 65-83.
- Wiar, L., Joseph, P.A., Petit, H., Dosque, J.P., de Seze, M., Brochet, B., Deminiere, C., Ferriere, J.M., Mazaux, J.M., Barat, M. (1998): The effect of capsaicin on the neurogenetic hyperreflexic detrusor. *Spinal Cord*. 36 (2): 95-99.
- Williams, E.G. и Maheswari, G. (1986): Somatic embryogenesis: Factors influencing co-ordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Horticultural Reviews* 57: 369-990.
- Wooderch, S.H. и сор. (1994): Effective Separation and Quantitative Analysis of Major Heat Principles in Red Pepper by Capillary Gas Chromatography. *Food Chemistry Vol. 49: 99-103*.
- Ying-Yue, W., Chi-Tzong, H., Wen-Ta, C., Jia-You, F. (2001): *In vitro* and *in vivo* evaluations of topically applied capsaicin and nonivamide from hydrogels, *Int. J. of Pharmaceutics*, 224: 89-104.
- Yoshiro Masada и сор. (1971): Analysis of the pugen principles of *Capsicum annuum* by combined gas chromatography mass spectrophotometry, *Journal of Food Science, Vol. 36:858-861*.
- Zhang, J., Nagasaki, M., Tanaka, Y., Morikawa, S. (2003): Capsaicin inhibits growth of adult T-cell leukemia cells, *Leukemia Research*, 27 (3): 275-283.