

КУЛТУРА НА АНТЕРИ ОД ПИПЕРКА (*Capsicum annuum* L.)

Колева-Гудева Лилјана

Краток извадок

Соматската ембриогенеза, 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.

Цел на овие истражувања беше да се постигне ефективна *in vitro* технологија за проучување на хаплоидни и дихаплоидни растенија-регенеранти; индукција на ембриогенеза во култура на антери од пиперка *in vitro*, како и микропропагација во услови *in vitro* на добиените регенерантите. Индуцирана е соматска ембриогенеза во култури на антери кај пет, од девет испитувани сорти на пиперка.

Клучни зборови: *Соматска ембриогенеза, in vitro, антери, пиперка (Capsicum annuum L.)*

ANTHER CULTURE IN PEPPER (*Capsicum annuum* L.)

Koleva-Gudeva Liljana

Abstract

Somatic embryogenesis has been defined as the developmental process producing a perfect embryo from a single cell, which achieves bipolar at as a stage as occurs in zygotic embryogenesis.

The main achievement of these examination was to establish *in vitro* effective technology for haploid and diploid plant regenerants; induction of embryogenesis from microspores in pepper anther culture as well as micropropagation *in vitro* of pepper regenerants. Induction of somatic embryogenesis from anther pepper culture was obtained in five from nine exanimate varieties of pepper.

Key words: *Somatic embryogenesis, in vitro, anthers, pepper (Capsicum annuum L.)*

1. Вовед

Со сексуалната генеративна репродукција бројот на хромозомите се редуцура 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).

Во култура на антери, кои содржат микроспори во стадиум на првата поленова делба или непосредно пред делбата ($n=x$), ако успешно се индуцира соматска ембриогенеза се добива хплоидни или диплоидни регенеранти.

Развојот и делбата на микроспорите во услови *in vivo* се одвива на следниот начин (слика 1 а):

1. Млада микроспора, вакуола неразвиена;
2. Средно-касна фаза од развојот на микроспората, вакуола присутна;
3. Нормално поларизирана прва поленова митоза;
4. Младо двоклеточно поленово зрно, генеративното јадро е кон зидота вакуолата е редуцирана;
5. Втора поленова митоза, вакуолата е многу редуцирана;
6. Зрело поленово зрно, нема вакуола, појава на две сперми и едно генеративно јадро.

Во услови *in vitro* (слика 1 б), после првата митоза се јавуваат неидентични (асиметрични) или идентични (симетрични) јадра. Резултатот после втората митоза е хплоид или диплоид, а диплоидни клетки се јавуваат со клеточна фузија.

Најраните истражување за соматска ембриогенеза на пиперка (*Capsicum annuum* L.) се на полето на андрогенеза со култура на антери и тоа: 1973, Kuo, Wang, Chein, Ku, Kung и Hsu; 1973, George и 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 хплоиди и диплоиди растенија (Kararakis, 1999). Користени се разни стрес третмани со цел да се зголеми соматската

ембриогенеза, од една страна, и да се зголеми продукцијата на хаплоиди, од друга страна.

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; колекционираните 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 капсаицинот, како 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*.

2. Матријал и метод на работа

Како материјал за индукција на соматска ембриогенеза во култура на антери, користени се незрелите пупки од пиперка, кои содржат антери со микроспори во стадиум на првата поленова делба или непосредно пред делбата (слика 3). Испитувањата се изведени со девет различни сорти на пиперка: слатко лута, лута везена, сиврија, феферона, златен медал, куртовска капија, калифорниско чудо, фехерозон и ротунд. 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 cm и тоа со конкавната страна да го допираат индуктивниот медиум. Стадиумот на делбата на микроспората е одредуван микроскопски со обојување на антерите со ацето кармин неколку минути, а потоа истите беа микроскопирани. Тоа обично е фаза на цветната пупка кога должината на цветните и венечните ливчина е еднаква и кога слободниот крај на антерата почнува да се обојува слабо виолетово.

Приготвувањето на бојата (ацето кармин) за одредување на стадиумот на микроспорите се врши на следниот начин: 1 g кармин

се растворува во 45 ml глацијална оцетна киселина, се додава уште 55 ml дестилирана вода, и се става на вриење околу 5 минути. Потоа, растворот се лади, се филтрира, и за интензивирање на бојата се додава 1-2 капки железенхидроксид. На изолираните антери се капнува од ацето карминот и по неколку минути истите се мацерираат на микроскопско предметно стакло и се набљудуваа во кој стадиум е микроспората.

Истражувањата за андрогенетскиот потенцијал на испитуваните сорти на пиперка изведеуван е по методот на Dumas de Valux, 1981. Според методот на овој автор, најпрво антерите се култивираат на медиумот CP + 0,01 mg/l KIN + 0,01 mg/l 2,4D, со инкубација на темно 8 дена и на +35±2°C, следните 4 дена во клима комора на +25±2°C со фотопериодизам 12 h светло / 12 h темно, а потоа истите се пренесуваат на медиумот R₁ + 0,01 mg/l KIN на +25±2°C, со фотопериодизам 12 часа светло и 12 часа темно.

3. Резултати и дискусија

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 и Fari, 1997).

Врз основа на добиените резултати може да се каже дека, сите испитувани сорти не се способни за формирање на хаплоидни ембриоиди. Всушност, ембриогенетски антери се јавуваат со статистичка сигнификантност само кај сортите: слатко лута (2,43±0,20*%, p=0,05), златен медал (3,31±0,24*%, p=0,05), куртовска капија (1,55±0,50*%, p=0,05), калифорниско чудо (6,16±0,28*%, p=0,05) и фехерозон (35,36±1,00***%, p=0,001) (табела 1, слика 2).

Забележана е и статистички сигнификантна позитивна корелација помеѓу процентот на ембриогенетски антери и бројот на формирани хаплоидни ембриоиди на 100 антери. Ваква висока вредност ($r=0,9389$, $p<0,05$) за Pearson-овиот коефициент за процентот на ембриогенетски антери во однос на бројот на формирани хаплоидни ембриоиди на 100 антери е и нормално очекуван резултат, бидејќи андрогенетски способните сорти нормално дека ќе формираат поголем број на хаплоидни ембриоиди (слика 2).

После индуктивниот период на CP медиум од 12 дена (на темно 8 дена на +35±2°C и 4 дена на +25±2°C 12/12 темно/светло), антерите беа префрлувани на R₁ медиум. CP медиум е неопходен само за индукција, односно за почеток на делба на микроспорите во

in vitro услови, каде неопходно е и присуство на ауксин. Но, веднаш по формирањето на ембриогенетската структурата (слика 4 и 5), од само една единствена микроспора, улогата на ауксинот се менува, бидејќи, тој понатаму го инхибира процесот на формирање на хаплоидни ембриоиди. Затоа неопходно е антерите да се култивираат на нов, R_1 медиум, во отсуство на ауксини. На овој медиум ембриоидите уште на самиот почеток покажуваат тотипотентност, напредуваат во својот раст и развој и формираат изданок.

На R_2 медиум, каде исто така, отсуствуваат ауксини а цитокининот е во повисока доза, не е препорачливо антерите да се држат повеќе од една недела. 7-8 дена. На повисока концентрација на цитокинин доволно е повторно да се стимулира тотипотентноста, а потоа ембриоидите пак се враќаат на R_1 медиум, каде формираат изданок.

Формираниот изданок го продолжува својот развој на V_3 медиум, каде без присуство на фитохормони се оформуваат млади растенија на хаплоидна пиперка (слика 6). Вкоренувањето настанува, исто така, на V_3 медиум, а добро вкоренетите изданоци се префрлуваат во стерилна мешавина на песок : перлит : терсет во сооднос 1 : 1 : 1 и се спремни за вообичаената адаптација и аклиматизација за во нестерилни услови.

4. Заклучок

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

- со слаб андрогенетски потенцијал - до 5% ембриогенетски антери;
- со просечен потенцијал - 5-10% ембриогенетски антери;
- со добар потенцијал- 15 - 30% ембриогенетски антери и
- со одличен андрогенетски потенцијал - над 30% ембриогенетски антери.

Резултатите од овие истражувањата покажаа дека хаплоидни ембриоиди се формираат на CP медиум со топол температурен стрес ($+35^{\circ}C$), што е во согласност со истражувањата на De Valux (1981). Од сите девет испитувани сорти, пет покажаа способност за формирање на ембриоиди и тоа:

- слатко лута - ($2,43 \pm 0,20\%$) со слаб андрогенетски потенцијал,
- златен медал - ($3,31 \pm 0,24\%$) со слаб андрогенетски потенцијал,
- куртовска капија - ($1,55 \pm 0,50$) со слаб андрогенетски потенцијал,

- калифорниско чудо - ($6,16 \pm 0,28\%$) со просечен потенцијал, и
 - фехерозон - ($33,66 \pm 6,02\%$) со одличен андрогенетски потенцијал.

Според класификацијата на гореспоменатите автори, како во нивните така и во овие испитувања добиени се идентични резултати, односно, сортата калифорниско чудо е со просечен, а сортата фехерозон е со одличен андрогенетски потенцијал.

Литература

Kaparakis, G. (1999): *In vitro* culture of pepper (*Capsicum annuum* L.), PhD theses -Kaparakis Georgis, Aristotle Univ. Hellas, submitted Univ. Nottingham, UK.

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.*

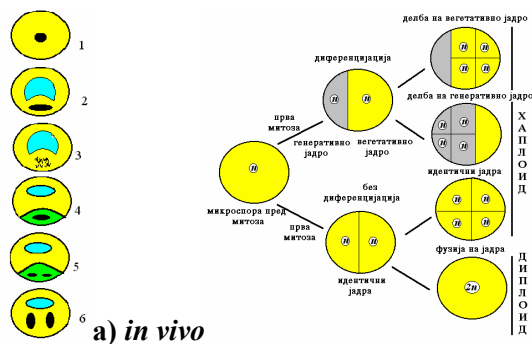
Mityko, Judit Andrasfalvy, G., Csillery, G., Fary. M. (1995): Anther culture response in different genotypes and F₁ hybrids of pepper (*Capsicum annuum* L.), *Plant Breeding 114, 78-80.*

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.*

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.*



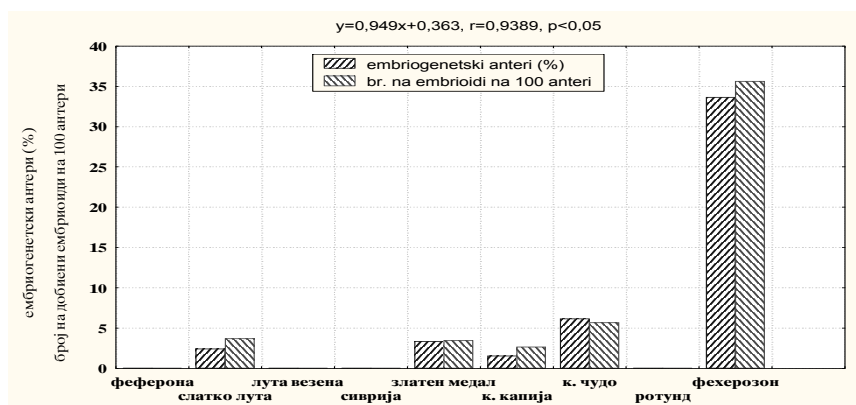
Слика 1. Развој на микроспори во услови *in vivo* и *in vitro* (Pierik, 1998)
 Figure 1. *In vivo* and *in vitro* development of microspores (Pierik, 1998)

Табела 1. Индукција на хаплоидни ембриоиди од антери на пиперка
 Table 1. Haploid embryo induction from pepper anthers

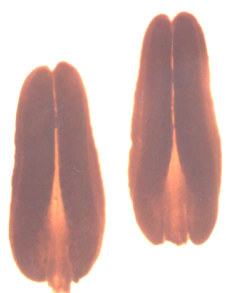
сорта пиперка pepper varieties	бр. на антери nr. of anthers	ембриогенетски антери (%) embryogenetic anthers (%)	бр. на ембриоиди на 100 антери nr. of embryos per 100 anthers	ембриогенетски потенцијал embryogenetic response
феферона	79±9	-	-	-
слатко лута	140±17	2,43±0,20*	3,33±0,57**	слаб/poor
везена лута	83±8	-	-	-
сиврија	104±15	-	-	-
златен медал	94±9	3,31±0,24*	,66±0,57**	слаб/poor
куртовска капија	120±11	1,55±0,50*	2,66±0,57**	слаб/poor
калифорниско чудо	151±15	6,16±0,28*	5,66±0,57**	просечен fair
ротунд	109±10	-	-	-
фехерозон	130±15	33,66±6,02**	55,36±1,00***	одличен excellent

*Вредностите во секоја колона означени со **, *** се сигнификантно различни ($p < 0,05$, t-тест на зависни примероци); $p = 0,05^*$, $p = 0,01^{**}$, $p = 0,001^{***}$; $\pm S.D.$, $n = 3$.

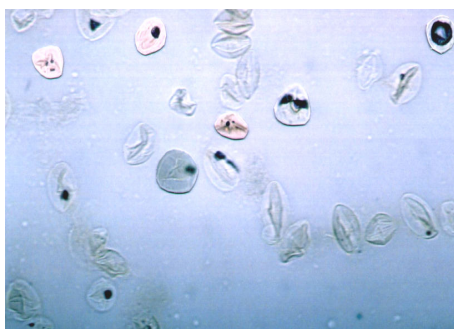
* The values in each column (group) marked with *, **, *** are significant different (t- test on dependent examples $p < 0,05$); $p = 0,05^*$, $p = 0,01^{**}$, $p = 0,001^{***}$; $\pm S.D.$, $n = 2$



Слика 2. Индукција на хаплоидни ембриоиди од антери на пиперка
 Figure 2. Haploid embryo induction from pepper anthers



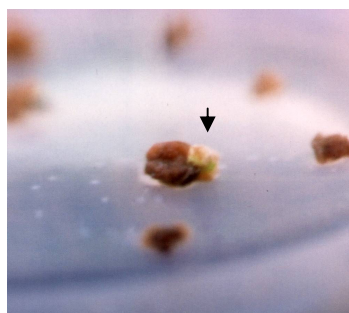
Слика 3; Figure 3



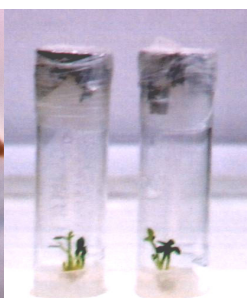
Слика 4; Figure 4

Слика 3. Изолирани антери од цветови на пиперка
Figure 3. Isolated anthers from pepper buds

Слика 4. Делба на микроспори од пиперка во *in vitro* услови
Figure 4. In vitro pepper microspore division



Слика 5; Figure 5



Слика 6; Figure 6

Слика 5. Појава на хаплоиден ембриод на CP медиум
Figure 5. Haploid embryo on CP medium

Слика 6. Култура на хаплоидни изданоци од пиперка на V_3 медиум
Figure 6. Haploid pepper shoots culture on V_3 medium